

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. H. Kewitz

PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AM CHOLINERGISCHEN SYSTEM DES GEHIRNS WÄHREND DER EMBRYONALEN ENTWICKLUNG DER RATTE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eberhard Mann
aus Guben

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550817_0089

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. H. Kewitz

PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AM CHOLINERGISCHEN SYSTEM DES GEHIRNS WÄHREND DER EMBRYONALEN ENTWICKLUNG DER RATTE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eberhard Mann
aus Guben

Referent: Professor Dr. med. Helmut Kewitz

Korreferent: Professor Dr. med. Helmut Coper



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5.1.1972

INHALTSANGABE	Seite
I. EINLEITUNG	3
II. MATERIAL UND METHODEN	8
1. Tiermaterial	8
2. Bestimmung des Gestationsalters	8
3. Präparation der Feten	10
4. Tötungsart	10
5. Fraktionierungsverfahren	11
a) Abtrennung des "freien" vom "labil" gebundenen Acetylcholin	12
b) Abtrennung des "labil" gebundenen Acetylcholins von der "stabil" gebundenen Fraktion	13
6. Extraktionsverfahren	14
a) Extraktion des "freien" und "labil" gebundenen Acetylcholins	14
b) Extraktion des "stabil" gebundenen Acetylcholins	15
c) Extraktion des gesamten Hirnacetylcholins	16
7. Chromatographieverfahren	16
8. Quantitative Acetylcholinbestimmungen	18
9. Verabreichte Pharmaka	21
a) DFP	21
b) Urethan	22
c) Atropin	22
10. Cholinesterasebestimmungen	22
11. Verwendete Chemikalien	26

III. ERGEBNISSE	Seite
1. Die Zunahme der AcetylcholinKonzentration während der Entwicklung des Gehirns bei der Ratte	27
a) "Freies", "labil" und "stabil" gebundenes Acetylcholin im Gehirn einer ausgewachsenen Ratte	27
b) Das Wachstum des Gehirns und die Zunahme des Acetylcholingehaltes in verschiedenen Fraktionen	29
2. Die Veränderungen der Acetylcholingehalte im Gehirn fetaler und ausgewachsener Ratten durch Pharmaka	45
a) DFP-Vergiftung	46
aa) Symptomatik	46
bb) Veränderungen des Acetylcholingehaltes	48
cc) Die Hemmung der Acetylcholinesteraseaktivität	53
b) Urethannarkose	56
aa) Symptomatik	56
bb) Veränderung des Acetylcholingehaltes	57
c) Atropinwirkungen	61
aa) Symptomatik	61
bb) Veränderung des Acetylcholingehaltes	61
IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	66
1. Die Zunahme des Acetylcholingehaltes in verschiedenen Fraktionen während der Gehirnentwicklung	66
2. Konzentrationsänderungen in den Fraktionen des Hirnacetylcholins embryonaler und ausgewachsener Ratten durch DFP, Urethan und Atropin	80
V. ZUSAMMENFASSUNG	88
VI. LITERATURVERZEICHNIS	91
VII. TABELLENANHANG	101

I. EINLEITUNG

Nach biochemischen Kriterien lassen sich die Neurone des Gehirns aufgrund ihrer Überträgerstoffe differenzieren. Charakteristische Bestandteile des cholinergischen Systems sind Acetylcholin, Cholinacetylase und Acetylcholinesterase. Sie sind in besonders hohen Konzentrationen in manchen Teilen der Stammganglien und in geringerer Menge auch in der Hirnrinde nachgewiesen worden. (NACHMANSOHN 1940; HEBB u. SILVER 1956; BEANI et al. 1964; ISHII u. FRIEDE 1967; FISCHER et al. 1969).

MacINTOSH u. OBORIN (1953) sowie GADDUM (1961) konnten zeigen, daß nach Inaktivierung der Acetylcholinesterase größere Mengen Acetylcholin ständig in das Interstitium abgegeben werden. Die Freisetzungsrates ist dabei offensichtlich abhängig vom Funktionszustand des Gehirns und läßt sich mit der Aktivität des Elektrokortikogramms korrelieren. Sie ist während der Narkose vermindert und nach elektrischer Stimulierung bestimmter subcorticaler Bezirke erhöht. (MITCHELL 1963; PHILLIS u. CHONG 1965; SZERB 1967). Das erklärt den Anstieg der Acetylcholin-konzentration im Gehirn während der Narkose, der schon lange vorher festgestellt worden war. (CROSSLAND u. RICHTER 1949; ELLIOTT, SWANK u. HENDERSON 1950). Durch Weckmittel kann die in der Narkose erhöhte Konzentration von Acetylcholin

innerhalb einer Minute wieder auf Normalwerte herabgesetzt werden. (HERKEN u. NEUBERT 1953).

Weitere Anhaltspunkte für eine Überträgerfunktion des Acetylcholins im Zentralnervensystem ergaben sich aus Untersuchungen mithilfe der mikroelektrophoretischen Applikation von Acetylcholin an Einzelzellen und Ableitung der Potentiale von dem gleichen oder postsynaptischen Neuron. Auf diese Weise wurden acetylcholinsensitive Zellen im Cortex (KRNJEVIC u. PHILLIS 1963), im Stammhirn (BRADLEY u. WOLSTENCROFT 1962; CURTIS u. KOIZUMI 1961), im Thalamus (ANDERSON u. CURTIS 1964), im Kleinhirn (McCANCE u. PHILLIS 1964), in der medulla oblongata (SALMOIRAGHI u. STEINER 1963) und im Rückenmark (CURTIS u. RYALL 1966) entdeckt. Die Reaktionen an diesen Zellen waren teils muskarinartig, seltener nikotinartig, häufig sowohl muskarinartig als auch nikotinartig am gleichen Neuron. Auf einige Zellen wirkte Acetylcholin nicht excitatorisch, sondern hemmte die Erregbarkeit.

Besondere Aufmerksamkeit galt wiederholt der Frage nach den strukturellen und chemischen Bindungen des Acetylcholins, in denen es für seine Überträgerfunktion bereitgestellt wird. Im Gehirn liegt ein Teil des Acetylcholins nämlich in gebundener Form vor, d.h. im Homogenat mit isotoner Lösung findet sich nur eine verhältnismäßig kleine Fraktion im wässrigen Überstand; der Rest dagegen ist an die Gewebs-

bestandteile gebunden. Der gebundene Anteil des Acetylcholins ist gegen die Acetylcholinesterase geschützt, die freies Acetylcholin mit großer Geschwindigkeit spaltet. Die Zellstrukturen, an die das Acetylcholin gebunden ist, wurden von BODIAN (1942) und später von BRODKIN u. ELLIOTT (1953) zunächst für Mitochondrien gehalten. Diese Vermutung schien sich zu bestätigen, als BELLAMY (1959) das gebundene Acetylcholin in einer Zellfraktion fand, die überwiegend aus Mitochondrien bestand.

Dann aber wurden Mitte der fünfziger Jahre mithilfe des Elektronenmikroskops erstmals die synaptischen Bläschen als charakteristische Bestandteile der präsynaptischen Nervenendigung erkannt. (de ROBERTIS u. BENNETT 1955). Durch verfeinerte Zellfraktionierungsmethoden gelang es GRAY u. WHITTAKER (1962) sowie de ROBERTIS und Mitarbeitern (1961), die "krude" Mitochondrienfraktion eines Hirnhomogenats im Dichtegradienten weiter aufzutrennen und die von den Axonen abgescherten Nervenendigungen zu isolieren. In diesen als "Synaptosomen" oder "NEP's" (nerve ending particles) bezeichneten Korpuskeln befand sich das gebundene Acetylcholin. In hypotoner Lösung gaben die Synaptosomen einen Teil des Acetylcholins frei, wobei gleichzeitig die sie umschließende Membran aufgelöst wurde. Der weiterhin gebundene Anteil des Acetylcholins fand sich in der Fraktion der synaptischen Bläschen,

die nun durch Zentrifugation abgetrennt werden konnte.
(de ROBERTIS, RODRIGUEZ de LORES ARNAIZ, SALGANICOFF,
PELLEGRINO de IRALDI und ZIEHER, 1963; WHITTAKER,
MICHAELSON und KIRKLAND, 1964).

Daraus wurde geschlossen, daß das gebundene Acetylcholin
zwei Kompartimenten in der Nervenzelle zugeordnet werden
kann, nämlich den synaptischen Vesikeln und dem Cytoplasma
der präsynaptischen Nervenendigungen.

Durch diese Befunde, die in der Folgezeit für verschiedene
andere Tierspezies bestätigt wurden (MARCHBANKS, 1968;
TAKENO et al. 1969), ist die Vorstellung gefestigt wor-
den, daß die Vesikel die eigentlichen Speicher für Acetyl-
cholin sind, aus denen der Überträgerstoff bei der Erregung
abgegeben wird.

Aufgrund dieser Vorstellung käme den Vesikeln bei der
Erregungsübertragung eine besondere Bedeutung zu; denn
durch sie wäre die Bereitstellung der notwendigen Mengen
des Überträgerstoffes gesichert. Damit gewinnt aber der
Vorgang der Vesikelbildung für die Erforschung der Synapsen-
funktion erhöhtes Interesse. Die Bildung von Vesikeln läßt
sich zum Beispiel während der Embryonalentwicklung des
Zentralnervensystems verfolgen. Aus elektronenoptischen
Untersuchungen von GLEZER (1969) geht hervor, daß die
synaptischen Bläschen bei der Ratte erst nach der Geburt
entwickelt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte erstens festgestellt werden, ob die Entwicklung von synaptischen Bläschen mit dem Auftreten von gespeichertem Acetylcholin parallel verläuft.

Zweitens war zu untersuchen, ob sich pharmakologische Eingriffe in die Synthese, Speicherung und Hydrolyse von Acetylcholin an den morphologisch und biochemisch noch nicht ausgereiften Neuronen und Synapsen anders auswirken als beim erwachsenen Tier. Deshalb war zu prüfen, in welcher Weise Pharmaka, die am cholinergischen System angreifen, den Stoffwechsel des Acetylcholins im embryonalen Rattengehirn beeinflussen.

Die dritte Frage betrifft die Auswirkungen auf den Ablauf der Hirnentwicklung, die sich aus Stoffwechseländerungen ergeben könnten. Da bei zahlreichen biochemischen Reaktionen die Veränderungen der Konzentrationen von Substrat oder Endprodukt auch Rückwirkungen auf die Enzymmenge in der Zelle ausüben, könnten pharmakologisch ausgelöste Änderungen der Acetylcholinkonzentration beim Embryo die Entwicklung des cholinergischen Systems beeinträchtigen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Tiermaterial

Die Untersuchungen wurden an Sprague Dawley Ratten beiderlei Geschlechts im Gestationsalter von 17 - 140 Tagen durchgeführt, das heißt, sie umfaßten die Zeit vom fünften Tag vor der Geburt bis zum Erwachsenenalter.

Die Tiere wurden in institutseigenen Ställen gezüchtet. Dazu wurden geschlechtsreife Ratten aus SPF-Kolonien der Firma MUS RATTUS AG aus Brunnthal, Obb., bezogen. Die Zuchttiere wurden in einem separaten Raum unter konstanten Bedingungen gehalten. 13 Stunden wurden sie künstlicher Beleuchtung ausgesetzt (von 13 - 2 Uhr), 11 Stunden herrschte Dunkelheit. Als Nahrung erhielten sie pelletiertes Alleinfutter der Firma ALTROMIN GmbH, Lage (Lippe), und Leitungswasser ad libitum.

Zur Zeit der Paarung wogen die Böcke (in Einzelkäfigen gehalten) 250 - 300 g, die Weibchen ca. 200 g.

2. Bestimmung des Gestationsalters

Um das Alter der Feten zu bestimmen, wurde der Zeitpunkt der Kopulation durch Vaginalabstriche kontrolliert (timing).

(SZABO et al. 1969)

Zur Paarung wurden die Weibchen im Verhältnis 1:2 oder 1:1 von 8.30 Uhr bis 11.30 Uhr zu den Böcken gesetzt, d. h. in den letzten Stunden der Dunkelheit, in denen die Böcke die

größte sexuelle Aktivität entfalten (KIEHLSTRÖM 1966). Anschließend wurden die Weibchen isoliert und die Vaginalabstriche innerhalb der nächsten drei Stunden durchgeführt. Um eine Pseudoschwangerschaft durch cervikale Stimulation zu vermeiden, wurde mit einem angefeuchteten Wattestäbchen nur der Introitus und das distale Ende der Vagina abgestrichen. Der Schmer wurde auf einen Objektträger aufgetragen und sofort als Nativpräparat lichtmikroskopisch auf Spermien hin untersucht. Als lange, glattbegrenzte, doppelkonturige Fäden waren sie leicht zu erkennen. Ihr Nachweis galt als Gestationsbeginn und wurde als Tag "0" bezeichnet.

Weibchen, bei denen sich ein (aus koaguliertem Ejakulationssekret bestehender) Vaginalpfropf fand, wurden ebenfalls als befruchtet angesehen. Sofern er äußerlich sichtbar war, wurde auf einen Abstrich verzichtet. Die cyclusbedingten Veränderungen des Vaginalepithels, an denen sich der Zeitpunkt der Ovulation erkennen läßt, blieben bei der mikroskopischen Untersuchung unberücksichtigt; denn Weibchen, die zwar kopuliert, nicht aber konzipiert hatten, konnten zur Zeit des Versuchsbeginns als nicht tragend aussortiert werden.

Die Altersangaben bei ausgetragenen Ratten wurden auf volle Tage nach der Geburt bezogen.

3. Präparation der Feten

Zur Aufarbeitung fetalen Gehirns wurden am gewünschten Gestationstermin die Muttertiere durch Nackenschlag getötet; die Bauchdecken und die Uteruswand wurden durch mediane Längsschnitte durchtrennt. Nacheinander wurden die Feten aus ihren Placentaanhängen befreit, gewogen und dekapitiert. Diese Prozedur dauerte etwa 30 Sek. für jeden Fetus. Nur wenn er deutliche Lebenszeichen wie spontane Körper- und Atembewegungen zeigte, wurde er für die Untersuchung verwandt. Feten, die nicht innerhalb von 5 - 7 Min. freipräpariert werden konnten, begannen, sich cyanotisch zu verfärben. Auch sie wurden nicht in die Untersuchungen miteinbezogen. Die jüngsten Feten waren 17 Tage alt. Sie entsprachen im Typus bereits dem Neugeborenen. Noch jüngere wurden nicht untersucht, weil sich ihr Gehirn nicht sicher und schnell genug von den weichen Kopfhäuten isolieren ließ.

4. Tötungsart

Alle Tiere wurden durch Dekapitation getötet. Innerhalb von 30 Sek. wurde der Kopf durch Auftupfen auf Zellstoff entblutet, das Gehirn in toto entnommen, gewogen und in das Homogenisierungsmedium gebracht.

5. Fraktionierungsverfahren

Das Hirnacetylcholin wurde in eine "freie", eine "labil" und eine "stabil" gebundene Fraktion aufgetrennt. Folgende Altersstufen wurden untersucht:

1. Fetale Ratten 17, 18, 19, 20 u. 21 Tage nach der Konzeption
2. Neugeborene Ratten bis zu sechs Stunden nach der Geburt
3. Heranwachsende Ratten im Alter von 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 20, 30 und 60 Tagen post partum
4. Ausgewachsene Ratten im Alter von vier Monaten

Dabei kam es darauf an, eine Spontanfreisetzung des Acetylcholins aus seinen Kompartimenten während der Fraktionierungsprozedur zu vermeiden. Das geschah unter Beachtung der Bindungseigenschaften: Im neutralen pH-Bereich ist Acetylcholin am festesten an das Gewebe gebunden (BRODKIN und ELLIOT 1953); im sauren (ab pH 6) wie im alkalischen Milieu (ab pH 8) brechen dagegen die Diffusionsbarrieren rasch zusammen und Acetylcholin tritt in Lösung über. Ebenso anfällig sind die Bindungen gegenüber Wärme, organischen Lösungsmitteln oder in begrenzter Weise auch mechanischen Einwirkungen. Da sich die Bindungsstellen in den Nervenendigungen (mittlerer Durchmesser $0,5 \mu$) befinden, dürfen sie bei der Aufarbeitung des Gehirns nicht vorzeitig zerstört werden. Aus diesem Grund erfolgte die Auftrennung nach der von KEWITZ und PLEUL (1968) entwickelten Methode: Zur schonenden Homogenisation des Hirngewebes wurde der Glashomogenisator mit Teflonpistill nach

Potter Elvehjem (Firma BRAUN, Melsungen) verwendet. Der Abstand zwischen Stempel und Glaswand betrug 0,1 mm. Eiskalte, isotone Ringerlösung, der Eserin zur Cholinesterasehemmung zugesetzt wurde, diente als Homogenisationsmedium. Sie enthielt im Liter: 9 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,1 g NaHCO₃; 1 g Glucose; 0,2 g CaCl₂ und 0,5 g Eserinsulfat, entsprechend $1,3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l; pH: 7,6.

a) Abtrennung des "freien" vom "labil" gebundenen Acetylcholin

Wenigstens 1 g Hirngewebe wurde in 8,5 ml eiskalter Ringerlösung durch 10 Auf- und Abbewegungen des Stempels bei einer Umdrehungszahl von 850 UpM unter Kühlung homogenisiert. Einzelgehirne von geringerem Gewicht wurden in entsprechender Anzahl gepoolt. Am 17. Tag der Gestation wurden alle Feten von zwei Muttertieren benötigt; später genügte ein Wurf. Die Suspension, die einen pH von 7,2 aufwies, wurde anschließend eine Stunde bei 100 000 g in der auf 4°C gekühlten präparativen Ultrazentrifuge (Modell L2-65 B der Firma BECKMAN Instruments, München) zentrifugiert. Dazu wurde ein vorgekühlter Festwinkelrotor vom Typ 50 Ti benutzt.

Acetylcholin, das sich danach, geschützt vor enzymatischer Hydrolyse durch Eserin, im Überstand befand, wurde als "frei" betrachtet und erhielt die Bezeichnung "Fraktion U". Durch Dekantieren wurde es von dem im Sediment gebundenen Anteil abgetrennt.

b) Abtrennung des "labil" gebundenen Acetylcholins
von der "stabil" gebundenen Fraktion

Das Sediment wurde in 8,5 ml eiskalter eserinhaltiger Ringerlösung wieder aufgeschwemmt. Unter ständiger Temperaturkontrolle wurde die Suspension im Eisbad 4 mal 30 Sek. einer Ultraschallwellenbehandlung mit dem Sonifier-Ultraschallgerät (Modell S 75 der Firma BRANSON SONIC POWER, Danbury, Conn.) unterzogen. Einstellung: 2 DC Ampère.

Danach wurde die Aufschwemmung wie beschrieben hochtourig zentrifugiert. Der Teil des Acetylcholins, der durch die Ultraschalleinwirkung aus den Zellrückständen freigesetzt worden war und sich nun im Überstand befand, wurde als "labil" gebunden betrachtet und erhielt die Bezeichnung: Fraktion "A". Der noch im Zelldetritus verbliebene Rest entsprach dem "stabil" gebundenen Acetylcholin. Es wurde als Fraktion "R" bezeichnet. Durch Dekantieren des Überstandes wurden die beiden Fraktionen voneinander getrennt. Solange auf einen annähernd neutralen pH-Bereich, auf die Isotonie des Mediums und auf die Temperatur (bis zu 5°C) geachtet wird, kommt es weder zu einer Diffusion aus den gebundenen Anteilen in Lösung infolge eines Konzentrationsgradienten noch zu einer meßbaren Rückverteilung des bei der Homogenisation oder durch Ultraschall freigesetzten Acetylcholins in die Zellfragmente.

6. Extraktionsverfahren

Wie schon angedeutet, wird Acetylcholin durch Säuren oder Alkalien vollständig aus seinen Bindungen gelöst. Basizität führt dabei zu spontanem Zerfall in Cholin und Essigsäure, während im sauren Milieu die Esterbindung stabil ist. Bei einem pH Optimum von 4 ist Acetylcholin hitzebeständig und kann selbst durch Kochen nicht zerstört werden. Bei pH 4 werden zugleich die auf- und abbauenden Enzyme inaktiviert, so daß sich die Acetylcholinkonzentration nicht mehr durch Stoffwechselprozesse verändern kann. Saure Medien dienen daher zur Extraktion des Acetylcholins aus einer Gewebsprobe.

a) Extraktion des "freien" und "labil" gebundenen Acetylcholins

Nach dem Dekantieren wurden die 100 000 g Überstände, die das "freie" und nach der Ultraschallbehandlung das "labil" gebundene Acetylcholin enthielten, mit 2-molarer Essigsäure auf pH 4 angesäuert und drei Minuten im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurde ausgefälltes Eiweiß bei 3000 UpM abzentrifugiert und die lösliche Phase im Wasserbad bei 70°C im Luftstrom bis zur Trockne eingeengt. Anschließend wurde Acetylcholin aus den Trockenrückständen mit 5 ml angesäuertem Äthylalkohol (STONE 1955) 15 Minuten lang extrahiert. Zusammensetzung: Eisessig 2ml, 96 %iger Äthylalkohol ad 1000 ml, pH 4.

Die unlöslichen Bestandteile wurden durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 3000 UpM abgetrennt und der alkoholische Extrakt im warmen Wasserbad im Luftstrom getrocknet. Um störende Lipide zu entfernen, wurden die Trockenextrakte in 1 ml aqua bidest. gelöst und mit etwa 20 Vol. Heptan und Amylalkohol (Mischungsverhältnis 1:2) zehn Minuten lang ausgeschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die organische Phase verworfen und die Ausschüttelprozedur mit Äther wiederholt. Nachdem der Äther wieder abgesaugt worden war, wurde die wässrige Lösung mit 2-molarer Essigsäure auf pH 4 angesäuert und bis zur Trockne eingedampft. Zur weiteren Reinigung schloß sich eine Extraktion mit 1 ml saurem Methanol an. Zusammensetzung : Eisessig 2 ml, Methanol ad 1000 ml, pH 4. Nach fünf minütiger Einwirkungszeit und kurzem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und erneut eingetrocknet.

b) Extraktion des "stabil" gebundenen Acetylcholins

Aus den ultraschallbehandelten und nach hochtouriger Zentrifugation sedimentierten Zellfragmenten wurde das "stabil" gebundene Acetylcholin zunächst 15 Min. lang mit 5 ml angesäuertem Äthanol durch gründliches Vermischen und Rühren extrahiert. Nach Abtrennung der unlöslichen, denaturierten Gewebsreste durch Zentrifugieren bei 3000 UpM wurde der alkoholische Extrakt wie üblich getrocknet. Lipidextraktion und Reinigung in Methanol-Eisessig schlossen sich wie beschrieben an.

c) Extraktion des gesamten Hirnacetyleholins

Um zu prüfen, ob die Summe von "freiem", "labil" und "stabil" gebundenem Acetylcholin auch wirklich dem Gehalt entspricht, der unmittelbar nach dem Tod der Tiere im Gehirn vorhanden ist, wurde das gesamte Acetylcholin aus Gehirnen von Tieren gleicher Würfe sofort nach der Dekapitation mit Äthanol-Eisessig extrahiert.

Alle Altersstufen nach der Geburt wurden auf diese Weise verglichen. Dazu wurden mindestens 750 mg Hirngewebe in 5 ml eissigsäurem 96 %igem Äthylalkohol unter Kühlung 10 bis 15 Sek. mit dem Ultraturrax (Firma JAHNKE und KUNKEL, Stauffen i. Br.) homogenisiert. Einzelgehirne von geringerem Gewicht wurden in ausreichender Zahl gepoolt. Nach einer Einwirkungszeit von 10 bis 15 Min. wurden die unlöslichen, denaturierten Gewebsreste durch Zentrifugieren bei 3000 UpM abgetrennt. Der Überstand wurde im warmen Wasserbad im Luftstrom getrocknet. Alle weiteren Extraktionsstufen erfolgten in der vorher angegebenen Reihenfolge.

7. Chromatographieverfahren

Vor der biometrischen Bestimmung des Acetylcholingehaltes in Gewebsextrakten ist es ratsam, den Ester von Cholin und anderen Cholinestern abzutrennen, da sie eine Acetylcholinwirkung vortäuschen können. Mit geeigneten Laufmitteln läßt sich die Auftrennung ohne nennenswerte Verluste durch Papierchromato-

graphie erreichen (DROSS 1965). Sie erfolgte im absteigenden System auf Papier Nr. 2034 bm (Firma SCHLEICHER u. SCHÜLL, Größe 27 x 60 cm). Dazu wurden die methanolischen Trockensextrakte in 0,2 ml bidest. Wasser aufgenommen und fleckförmig im Abstand von 3 cm auf die Startlinie aufgetragen. Jedes Probenglas wurde zweimal nachgewaschen. Folgende Laufmittel kamen nacheinander zur Anwendung:

1. Als neutrales Lösungsmittel ein Gemisch von 4 Vol. n-Propanol und 1 Vol. 0,8-molaren Ammoniumacetat
Laufzeit ca. 15 Stunden;
2. Als saures Lösungsmittel ein Gemisch von 6 Vol. n-Butanol, 2 Vol. n-Propanol, 1 Vol. absoluter Äthanol, 1 Vol. 80 %ige Ameisensäure und 2 Vol. Aqua bidest. Laufzeit ca. 15 Stunden.

Zur Ermittlung der Laufstrecke liefen zu beiden Seiten der Proben authentisches Acetylcholin und Cholin (beide als Chlorid^{*)}) mit. Ihre Identifizierung erfolgte mit einem nach KEWITZ (1959) modifiziertem Dragendorff'schen Reagenz^{**}).

^{*)} = Acetylcholinchlorid stammte von der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach; Cholinchlorid p.a. wurde von der E. Merck AG, Darmstadt, bezogen.

^{**}) = Herstellung von Dragendorff's Reagenz (modifiziert nach KEWITZ). Stammlösung: 2,6 g basisches Wismutkarbonat ($(\text{BiO})_2 \text{CO}_3 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$) und 7 g Natriumjodid werden unter Aufkochen in 26 ml Eisessig gelöst. Nach dem Abkühlen werden die ausgefallenen Natriumacetatkristalle abfiltriert und dem Filtrat 4 Vol. Essigsäureäthylester zugesetzt. Diese Stammlösung ist unter Lichtschutz unbegrenzt haltbar. Gebrauchslösung: Unmittelbar vor der Anfärbung werden 4 Vol. der Stammlösung mit 5 Vol. Eisessig und 12 Vol. Essigsäureäthylester versetzt.

Cholin erschien auf den angefärbten Kontrollstreifen als violetter, Acetylcholin als rosafarbener Fleck. Die dem Acetylcholin entsprechenden Areale der Proben wurden aus dem Papier ausgeschnitten und mit auf pH 4 durch Essigsäure angesäuertem bidestillierten Wasser bis zu einem Volumen von etwa 1 ml eluiert.

8. Quantitative Acetylcholinbestimmungen

Prinzip

Bis jetzt ist noch keine genügend empfindliche chemische Methode zur quantitativen Erfassung von Acetylcholin bekannt. Zur Messung dienen daher pharmakologische Wirkungen, die Acetylcholin dosisabhängig auf bestimmte biologische Präparate ausübt.

Als gängige Verfahren gelten die Registrierung von Kontraktionen des Meerschweinchenileums (BENTLEY und SHAW 1952), des Blutegelrückenmuskels (Mac INTOSH und PERRY 1950), des geraden Bauchmuskels des Frosches (CHANG und GADDUM 1933), und die Messung der Blutdrucksenkung bei eviscerierten Katzen (Mac INTOSH und PERRY 1950). Die Präparationen unterscheiden sich hinsichtlich der Schnelligkeit der Reaktion, der Reproduzierbarkeit der Resultate und der Spezifität für Acetylcholin beträchtlich.

In dieser Arbeit wurden die Bestimmungen am musculus rectus abdominis des Froschs (*rana temporaria*) durchgeführt. Er bietet folgende Vorteile: Seine Kontraktionen hängen im Testbe-

reich linear von der Dosis ab; sie lassen sich gut reproduzieren, sind schnell und unabhängig von der Umgebungstemperatur. Der Muskel spricht spezifisch auf Cholinester an, während andere biologisch aktive Substanzen wie Histamin, Serotonin oder Substanz P nicht störend interferieren. Eine Potenzierung der Acetylcholinwirkung durch Kalium oder Phosphate tritt nur bei unphysiologisch hohen Mengen auf. Nachteilig ist seine geringere Empfindlichkeit, die jedoch durch Eserinzusatz zur Badflüssigkeit verbessert werden kann. Da der Muskel außerdem auf andere Cholinester und auf Cholin (in hoher Konzentration) ansprechen kann, ist es ratsam, Acetylcholin chromatographisch abzutrennen.

Messungen

Beide mm. rect. abd. eines Frosches wurden von Fascien befreit und in je einem 5 ml fassenden Glasgefäß befestigt. Über einen Hebel, der die isotonen Kontraktionen registrieren sollte, wurden sie mit einem Rußkymographion verbunden.

Als Badflüssigkeit diente Ringerlösung für Amphibien. Sie enthielt im Liter: 6,4 g NaCl, 300 mg KCl, 170 mg CaCl_2 , 330 mg NaHCO_3 , 700 mg Glucose und 8 mg Eserinsulfat. Sie wurde mit Luft durchperlt, um eine gute Durchmischung mit den Testlösungen zu gewährleisten. Mit der Analyse der Proben wurde frühestens 30 Min. nach der Präparation begonnen, um eine gute Ausgangserschaffung zu erreichen. Ihr ging eine Empfindlichkeitstestung des Muskels mit einer Acetylcholin-Standard-

lösung voraus (1 γ Acetylcholin/ml). Sie wurde jeweils am Tag der Messung aus einer Stammlösung durch Verdünnung mit aqua bidest. hergestellt. Die Stammlösung enthielt 10 mg Acetylcholinchlorid/ml H_2O (aqua bidest.), sie war mit Essigsäure auf pH 4 angesäuert und wurde bei $-20^{\circ} C$ aufbewahrt. Die durchschnittliche Schwellendosis lag bei 0,013 γ /ml Badflüssigkeit. Überstieg sie eine Konzentration von 0,04 γ /ml, wurde die Präparation als zu unempfindlich nicht verwandt. Unmittelbar vor der Testung wurden die getrockneten Eluate aus den Chromatogrammen mit 1 ml demineralisiertem Wasser verdünnt; ein geeignetes Volumen wurde in die Badflüssigkeit einpipettiert. Gleichzeitig wurde das Kymographion in Bewegung gesetzt.

Die Kontraktionszeit wurde auf zwei Minuten begrenzt. Dann hielt eine Zeituhr den Kymographen automatisch an. Die Badflüssigkeit wurde abgelassen, die Muskeln gründlich mit Ringerlösung gespült. Danach folgte eine zweiminütige Erschlaffungspause.

Da die Empfindlichkeit der Muskeln im Tagesablauf etwas schwankte, wurde jede Probenanalyse von zwei Eichmessungen mit der Standardlösung eingeschlossen. Aus dem Vergleich mit dem vorangehenden und nachfolgendem Eichausschlag ließ sich die Acetylcholinmenge des Extraktes berechnen. Von jeder Probe wurden, sofern nicht anders vermerkt, zwei Parallelbestimmungen an beiden Muskeln durchgeführt. Wenn die Ergebnisse um mehr als $\pm 5 \%$ vom Mittelwert abwichen, wurden die

Messungen wiederholt.

Die Acetylcholinmengen in den Extrakten wurden in n-Mol Acetylcholin umgerechnet und auf 1 g Hirn (Frischgewicht) bezogen.

9. Verabreichte Pharmaka

Analysen der Acetylchlinkonzentration im Gehirn fetaler Ratten nach Vorbehandlung der Muttertiere mit einigen Pharmaka wurden einheitlich am 20. Tag der Gestation vorgenommen. Die Auftrennung, Extraktion und Bestimmung des Acetylcholins erfolgte in der üblichen Weise. Für alle Versuche dienten 120 Tage alte Ratten als ausgewachsene Vergleichstiere.

a) Diisopropylfluorophosphat (DFP*)

1 Stunde, 24 Stunden bzw. 9 Tage vor der Tötung wurde den Muttertieren 1,8 mg DFP/kg Körpergewicht in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, subcutan injiziert (0,5 mg/ml 0,9 % NaCl). Die Applikation, die neun Tage vorher vorgenommen wurde, entsprach dem Zeitpunkt, an dem sich die Vorderhirnhälften einander nähern, nämlich dem 11. Tag der Gestation. Zusätzlich zu den Acetylcholinbestimmungen wurde bei den Müttern und einem Teil der Feten die Aktivität der Acetylcholinesterase bestimmt.

* DFP wurde freundlicherweise von der BAYER AG, Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

b) Urethan

Die Muttertiere wurden mit Urethan (E. Merck AG, Darmstadt) in einer Dosierung von 1,5 g/kg Körpergewicht narkotisiert. Es wurde ihnen in Wasser gelöst (300 mg/ml H₂O pro injectione) hoch intraperitoneal appliziert, um eine Verletzung des Uterus zu vermeiden.

Nach genau einer Stunde wurden die Muttertiere durch Nackenschlag getötet und die Feten durch Sectio freipräpariert.

c) Atropin

15 Minuten vor der Tötung durch Nackenschlag wurde den Muttertieren 25 mg/kg Körpergewicht Atropinsulfat (Atropinum sulfuricum cryst. der E. Merck AG, Darmstadt) in wässriger Lösung (12,5 mg/ml H₂O pro injectione) in die Schwanzvene injiziert.

10. Cholinesterasebestimmungen

Die Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn wurde bei allen mit DFP vorbehandelten Tieren und entsprechenden unbehandelten Kontrollen bestimmt. Die Messungen erfolgten titrimetrisch mit der pH-Stat-Methode nach JENSEN-Holm et al. 1959.

Prinzip

Essigsäure, die bei der enzymatischen Spaltung exogenen Acetylcholins entsteht, wird kontinuierlich mit Natronlauge auf einen fest eingestellten pH-Wert titriert. Aus dem Verbrauch der Natronlauge läßt sich die Acetylcholinesteraseaktivität berechnen.

Apparatur

Zur vollautomatischen Titration diente das Titrator Modell 11 (Firma Radiometer, Kopenhagen), das mit der 0,25 ml fassenden Autoburette Typ ABU 1 B ausgestattet war. Der pH wurde mit Glas- und Kalomel-Elektrode mit dem pH Meter 26 gemessen und auf einen Titrationsendpunkt von 7.4 eingestellt. Durch den Titrigraphen SBR-2C wurde der Natronlaugenverbrauch automatisch registriert. Die Geschwindigkeit des Papiervorschubes richtete sich nach der Enzymaktivität; er lag zwischen 1 und 4 cm/Min.

Reagentien

Als Reagentien wurden benötigt:

1. Eine Eichpufferlösung pH 6,5 (hergestellt aus 1 ml "concentrated buffer Typ S 1001, (Radiometer, Kopenhagen) durch Verdünnung mit CO₂ freiem bidest. Wasser auf 25 Vol.)
2. Titrationsflüssigkeit (bestehend aus 0,01 n Natronlauge)
3. Enzymsubstrat (Acetylcholinchlorid 1×10^{-3} molar)

Messungen

Die Versuchstiere wurden durch Dekapitation getötet, der Kopf sorgfältig entblutet, das Gehirn in toto entnommen und anhaftendes Blut mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Nach dem Wiegen wurden die Gehirne in eiskalter physiologischer NaCl-Lösung mit dem Ultraturrax homogenisiert. Je fünf fetale Gehirne wurden zusammen verarbeitet. Die Gewebskonzentration im Homogenat wurde auf 20 % eingestellt. Noch am gleichen Tag wurden die Messungen durchgeführt.

Nach Inbetriebnahme der Apparatur wurde zunächst das pH-Meter mit der Pufferlösung geeicht, temperaturkorrigiert und der Titrationsfestpunkt eingestellt. Die Esterasebestimmungen erfolgten in drei Stufen:

1. Zunächst wurde der Meßansatz 10 Minuten im Wasserbad von 37°C äquilibriert.
2. Dann wurden die Proben vom Ausgangs-pH, der zwischen 6,7 und 7,0 schwankte, auf pH 7,4 titriert und auf unspezifische, nicht enzymatisch bedingte Säurefreisetzung hin kontrolliert. Zu ihrer Bewertung genügte meist eine Meßdauer von 5 Minuten.
3. Zuletzt wurde die Substratlösung zugesetzt.

Die dadurch bedingte plötzliche Säuerung wurde automatisch neutralisiert. Dann begann die Titration der aus Acetylcholin abgespaltenen Essigsäure. Je nach Enzymaktivität dauerten die Messungen zwischen 3 und 15 Minuten. Das Meßvolumen betrug 2 ml, die Lösung war folgendermaßen zusammengesetzt:

0,1 ml Homogenat (= 20 mg Gewebe)
+ 1,8 ml physiol. NaCl
+ 0,1 ml 2×10^{-2} mol. Acetylcholinchlorid

endgültige Gewebskonzentration: 1 %
Substratkonzentration: 1×10^{-3} mol.

Fand sich in den Proben keine oder kaum meßbare Aktivität, wurden die Bestimmungen mit 5 oder 10 %iger Gewebskonzentration wiederholt. Dementsprechend veränderte sich die Zusammensetzung des Meßansatzes. Um eine Säuerung durch den CO₂-Gehalt der Luft während der Messungen zu vermeiden, wurden die Proben mit Stickstoff überblasen. Ein Magnetrührer verhinderte die Sedimentation der Gewebsfragmente.

Berechnung der Enzymaktivität

Die Acetylcholinesteraseaktivität ((AchE)) wurde in n-Mol hydrolysiertem Acetylcholin/mg Hirngewebe (Frischgewicht) pro Minute ausgedrückt. Sie berechnet sich aus dem Natronlaugenverbrauch nach der Formel:

$$\begin{aligned} ((\text{AchE})) &= \\ * \frac{\mu\text{l verbrauchte } 0,01 \text{ n NaOH nach Substratzusatz} \cdot 10}{\text{mg Hirngewicht} \cdot \text{Zeit (Min.)}} \\ &\text{minus} \\ ** \frac{\mu\text{l verbrauchte } 0,01 \text{ n NaOH vor Substratzusatz} \cdot 10}{\text{mg Hirngewicht} \cdot \text{Zeit (Min.)}} \end{aligned}$$

* Gesamtverbrauch

** Verbrauch durch unspezifische Säurefreisetzung

11. Verwendete Chemikalien

Alle Chemikalien wurden fertig aus dem Handel bezogen.
Sie wiesen den Reinheitsgrad "reinst" oder "pro analysi"
auf.

III. ERGEBNISSE

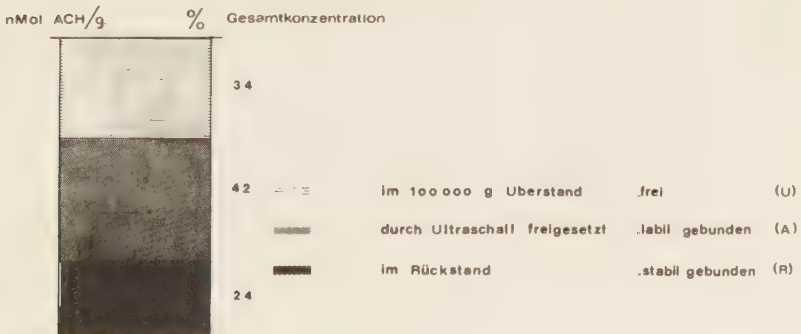
1. Die Zunahme der Acetylcholinkonzentration während der Entwicklung des Gehirns bei der Ratte

Den Ausgangspunkt für die Analysen der Acetylcholinkonzentration im Gehirn heranwachsender Ratten bildeten die Befunde von KEWITZ und PLEUL (1968), nach denen sich Acetylcholin im Gehirn ausgewachsener Ratten in drei in vitro nicht miteinander kommunizierende Fraktionen aufteilen läßt, in denen nach der Einwirkung bestimmter Pharmaka charakteristische Konzentrationsveränderungen auftreten.

a) "Freies", "labil" und "stabil" gebundenes Acetylcholin im Gehirn einer ausgewachsenen Ratte

Ratten im Alter von 4 Monaten (Gestationsalter 142 Tage) dienten als erwachsene Kontrolltiere, da bei ihnen das Zentralnervensystem funktionell voll ausdifferenziert ist.

Abb. 1: Verteilung der Acetylcholinfraktionen auf die Gesamtkonzentration im Gehirn einer ausgewachsenen Ratte (Gestationsalter 142 Tage)



In Abb. 1 ist dargestellt, wie sich "freies", "labil" und "stabil" gebundenes Acetylcholin auf den Gesamtgehalt verteilen.

Als "freies" Acetylcholin oder Fraktion "U" wird die Portion bezeichnet, die sich nach dem Homogenisieren der Gehirne in eiskalter, isotoner Ringerlösung, die Eserin enthält, nach einstündigem Zentrifugieren bei 100 000 g im Überstand befindet. Diese Fraktion enthält beim ausgewachsenen Tier im Mittel 5,05 n-Mol Acetylcholin/g Hirn (Frischgewicht); das sind 34 % vom Gesamtgehalt.

Die übrigen 66 %, d. h. 9,82 n-Mol Acetylcholin/g Hirn, bleiben im Rückstand gebunden. Als "labil" gebunden oder Fraktion "A" gilt der Teil des Acetylcholins, der nach dem Suspendieren in Ringerlösung durch eine Ultraschallbehandlung freigesetzt wird und nach erneutem Zentrifugieren im 100 000 g Überstand gelöst vorliegt. Ultraschalllabil sind 6,2 n-Mol Acetylcholin/g Hirn; das sind knapp 42 % von der Gesamtmenge bzw. 63 % von dem an das Gewebe gebundenen Anteil.

Der Rest, der sich nach der Sonifikation noch aus dem Zelldetritus durch Eiweißdenaturierung und Säure extrahieren läßt, entspricht dem "stabil" gebundenen Acetylcholin oder Fraktion "R". 3,62 n-Mol Acetylcholin/g Hirn enthaltend, beteiligt sich diese Fraktion mit 24 % am gesamten bzw. mit 37 % am gesamtgebundenen Acetylcholin. Die Konzentrationen des gebundenen zum "freien" Acetylcholin verhalten sich wie 1,95:1. "Labil" gebundenes Acetylcholin ist um den Faktor 1,74 größer als das "stabil" gebundene.

b. Das Wachstum des Gehirns und die Zunahme des Acetylcholingehaltes in verschiedenen Fraktionen.

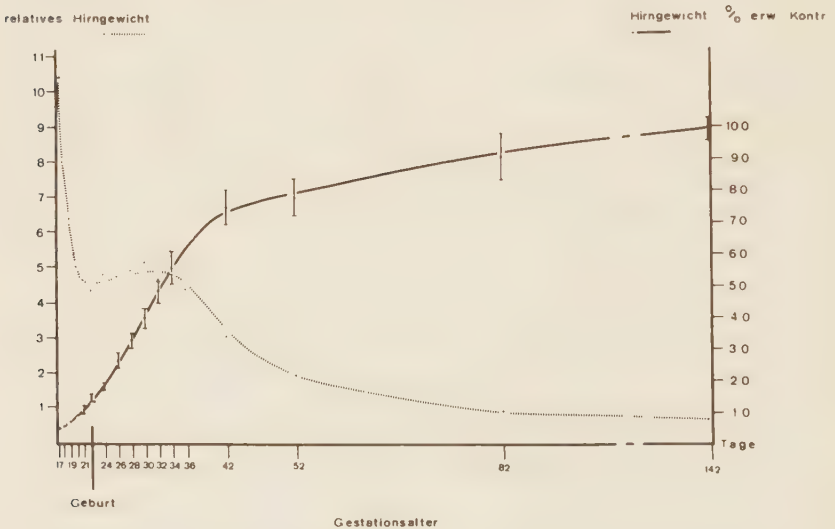
Die Konzentration des Acetylcholins wurde auf das Gehirngewicht bezogen. Die Gewichtsentwicklung ist in Tabelle 1 und in Abbildung 2 dargestellt.

Am 17. Gestationstag, d.h. fünf Tage vor der Geburt, dem Zeitpunkt, an dem mit den Untersuchungen begonnen wurde, wiegt das Gehirn des Feten erst 73 mg; das sind nur 4 % von dem Gewicht, das das Gehirn einer ausgewachsenen Ratte wiegt. Bis zur Geburt, die bis auf wenige Ausnahmen im Laufe des 22. Tages nach der Konzeption stattfand, vergrößert es sich um etwa das dreieinhalbfache und wiegt nun knapp 15 % vom endgültigen Gewicht. Am schnellsten wächst das Gehirn erst postnatal während der ersten drei Lebenswochen. Von der Geburt bis zum 6. Tag vermehrt sich sein Gewicht um mehr als das Doppelte, bis zum 12. Tag vervierfacht es sich, und am 20. Tag wiegt es rund das fünffache; das entspricht 33 %, 57 % bzw. 76 % vom Endgewicht. Danach verlangsamt sich die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich. Am 60. Tag, wenn sich das Gehirngewicht nur noch unwesentlich von dem einer vier Monate alten Ratte unterscheidet, wiegt es das sechsfache von dem Gehirn eines neugeborenen Tieres. Die Beziehung zum Körperwachstum ergibt sich durch das relative Hirngewicht, das ist der prozentuale Anteil des Hirngewichts am Körpergewicht.

Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, wächst zunächst in der Fetalzeit der Körper schneller als das Gehirn. Das relative Hirngewicht fällt von rund 10 auf 6 % bis zum 3. Tag vor der Geburt. Danach wachsen Körper und Gehirn bis zum Ende der zweiten Lebenswoche etwa gleich schnell. Das Gehirn wiegt in dieser Zeit durchschnittlich 4,8 % vom Körpergewicht.

Abb. 2

Die Gewichtsentwicklung des Gehirns



Legende:

Das Hirngewicht der ausgewachsenen Ratten betrug $1,78 \pm 0,07$ g (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

Relatives Hirngewicht in % = $\frac{\text{Hirngewicht} \cdot 100}{\text{Körpergewicht}}$

Gestations- alter in Tagen	Zahl der Tiere	Hirngewicht g	Körpergewicht g	relatives Hirngewicht %
17	68	$0,073 \pm 0,008$	$0,699 \pm 0,075$	$10,43 \pm 1,07$
18	80	$0,096 \pm 0,000$	$1,208 \pm 0,092$	$7,99 \pm 0,87$
19	72	$0,121 \pm 0,0087$	$1,895 \pm 0,139$	$6,37 \pm 0,5$
20	89	$0,157 \pm 0,01$	$3,19 \pm 0,3$	$4,96 \pm 0,45$
21	100	$0,192 \pm 0,02$	$4,69 \pm 0,54$	$4,62 \pm 0,41$
22 (Geburt)	78	$0,258 \pm 0,017$	$6,111 \pm 0,52$	$4,23 \pm 0,25$
24	66	$0,318 \pm 0,017$	$6,6 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,44$
26	38	$0,471 \pm 0,045$	$9,82 \pm 1,08$	$4,76 \pm 0,4$
28	52	$0,584 \pm 0,042$	$11,87 \pm 0,887$	$4,94 \pm 0,37$
30	40	$0,708 \pm 0,056$	$15,48 \pm 1,38$	$5,33 \pm 0,71$
32	34	$0,866 \pm 0,118$	$18,94 \pm 2,29$	$4,61 \pm 0,56$
34	28	$1,01 \pm 0,09$	$21,44 \pm 1,84$	$4,78 \pm 0,51$
36	37	$1,089 \pm 0,046$	$25,37 \pm 2,65$	$4,32 \pm 0,31$
42	22	$1,344 \pm 0,087$	$45,56 \pm 8,6$	$3,03 \pm 0,46$
52	19	$1,599 \pm 0,101$	$71,61 \pm 6,62$	$1,97 \pm 0,16$
62	9	$1,691 \pm 0,118$	$165,9 \pm 55,8$	$1,02 \pm 0,18$
1	18	1	$272,0 \pm 12,0$	$0,65 \pm 0,04$

Während sich in der dritten Lebenswoche das Körperwachstum weiter beschleunigt, läßt die Vergrößerung des Gehirns allmählich nach. Schließlich beträgt das Hirngewicht einer ausgewachsenen Ratte im Vergleich zum Körpergewicht nur noch 0,65 %.

Unmittelbar nach der Geburt stagniert das Körperwachstum kurzfristig (bis zum 2. Tag post partum). Davon bleibt die Hirngewichtszunahme unbeeinflußt.

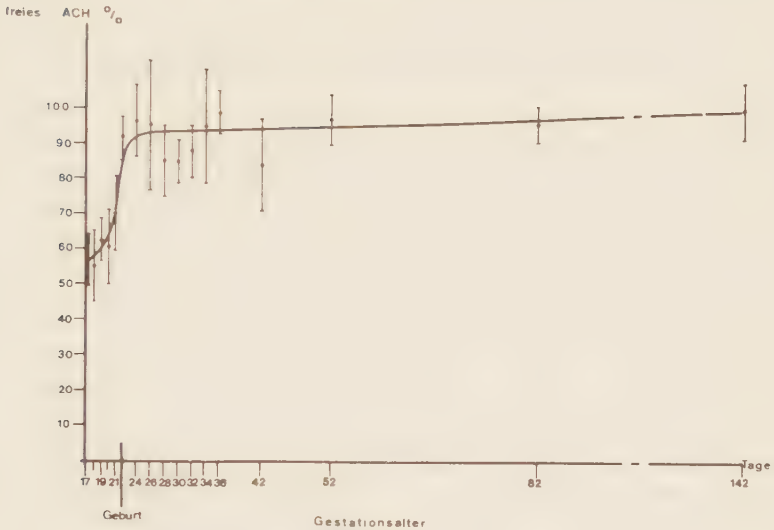
Die Fraktionen des Acetylcholins im Gehirn, die sich auch bei unreifen Ratten gut voneinander abgrenzen lassen, entwickeln sich mit verschiedener Geschwindigkeit (Tab. 2 und Abb. 3 - 6).

Am 17. Tag der Gestation beträgt die Konzentration des Cholinesters im gesamten Gehirn erst 3,52 n-Mol/g Hirn, das sind knapp 24 % der beim ausgewachsenen Tier vorhandenen Konzentration. Der größte Anteil, nämlich 2,84 n-Mol/g oder 81 % ist "freies", der Rest "labil" gebundenes Acetylcholin. "Stabil" gebundenes Acetylcholin ist zu dieser Zeit überhaupt noch nicht vorhanden.

Von der endgültigen Konzentration in der "freien" Fraktion enthält das fetale Gehirn jetzt bereits über die Hälfte (Abb. 2). In den nächsten Tagen, bis zur Geburt, nimmt die Konzentration rasch weiter zu. Am steilsten ist der Anstieg in der Periode, während der die Geburt erfolgt. Vom letzten

Abb. 3

Die Entwicklung der "freien" Acetylcholinfraktion.



Legende: Angaben der Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung in % der Konzentration im Gehirn ausgewachsener Ratten.

100 % = 5,05 n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)

Das Alter der Ratten in Tagen nach der Geburt ergibt sich aus dem Gestationsalter abzüglich 22 (Gestationszeit).

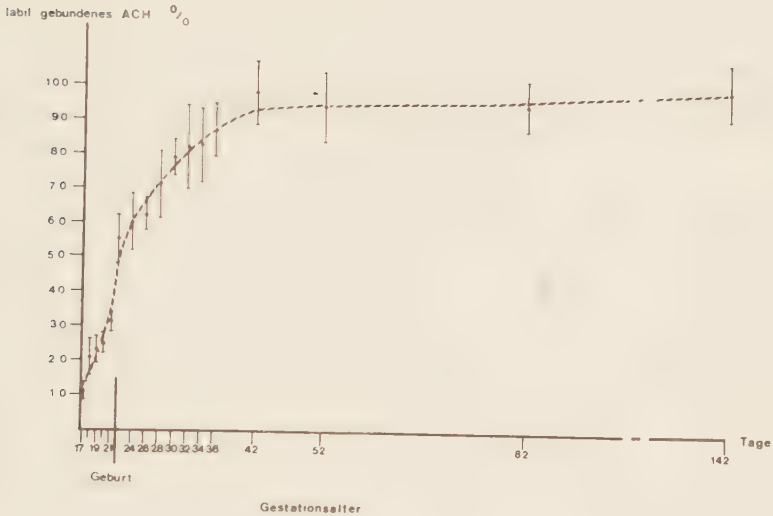
Tag der Tragzeit bis unmittelbar nach der Geburt vermehrt sich das "freie" Acetylcholin um 1,1 n-Mol/g von 70 auf über 90 % der Norm ausgewachsener Tiere. Danach verändert

sich die Konzentration nicht mehr wesentlich. Da das Gehirn postnatal jedoch noch erheblich weiter wächst und die Konzentration konstant bleibt, muß sich von nun an die "freie" Fraktion mit der gleichen Geschwindigkeit mitentwickeln.

Anders verhält sich das "labil" gebundene Acetylcholin (Abb. 4) Diese Fraktion ist fünf Tage vor der Geburt in gerade meßbarer Menge vorhanden: Es finden sich erst 0,68 n-Mol/g Hirn, das entspricht 11 % der Menge, die bei ausgewachsenen Tieren vorliegt. Allerdings steigt in den folgenden Tagen die Konzentration steiler an als beim "freien" Acetylcholin. In den Stunden der Geburt kommt es zu einer Erhöhung um 1,8 nMol/g, das bedeutet nahezu eine Verdoppelung. Durch diesen sprunghaften Anstieg wächst der "labil" gebundene Anteil auf mehr als die Hälfte der endgültigen Konzentration an. Unmittelbar nach der Geburt verlangsamt sich der Anstieg allmählich. Nach einer Woche finden sich 75 % und nach zwei Wochen gut 85 % des Endwertes. Schließlich wird gegen Ende der dritten Lebenswoche ein Wert erreicht, der sich wie die folgenden um weniger als 10 % von dem erwachsenen Tiere unterscheidet, d.h. die weitere Zunahme erfolgt mit gleicher Geschwindigkeit wie die Zunahme des Hirngewichts.

Am langsamsten entwickelt sich die "stabile" Fraktion R (Abb. 5) In dieser Fraktion läßt sich erstmals am Tage vor der

Abb. 4 Die Entwicklung der "labil" gebundenen Acetylcholinfraktion.

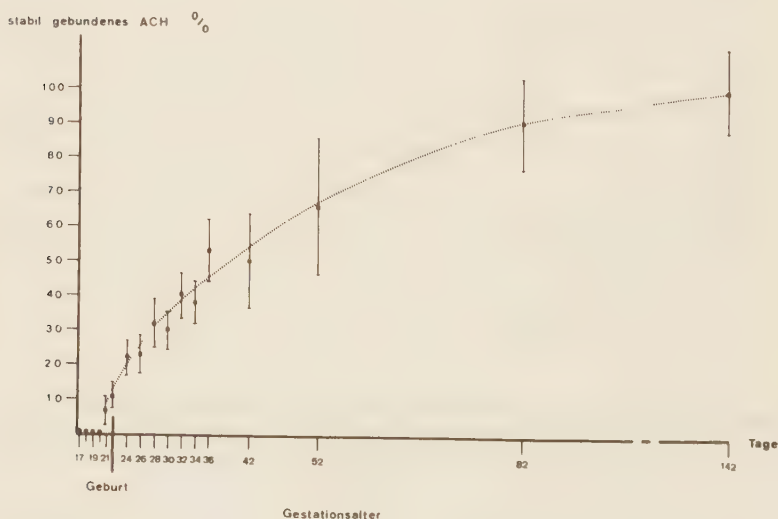


Legende: Angaben der Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung in
% der Konzentration im Gehirn ausgewachsener Ratten.
100 % = 6,2 n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)

Geburt Acetylcholin nachweisen. Unmittelbar nach der Geburt enthält sie erst 0,39 n-Mol Ach/g Hirn, das sind weniger als 7 % von der Konzentration im murenen Gehirn. Nach zwei Tagen ist knapp ein viertel vorhanden, nach

zwei Wochen etwa die Hälfte, zwei drittel am Ende des ersten Lebensmonats, und erst, wenn das Wachstum des Gehirns abgeschlossen ist, wird die Menge gefunden, die bei ausgewachsenen Tieren vorhanden ist.

Abb. 5 Die Entwicklung der "stabil" gebundenen Acetylcholinfraktion.



Legende: Angaben der Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung in % der Konzentration im Gehirn ausgewachsener Ratten.

100 % = 3,62 n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)

Gest.- alter (Tage)	Zahl der Exp.	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)					X	Y
		U	A	R	Gesamt			
17	4	2,84 ± 0,32	0,68 ± 0,15	n. meßbar	3,52 ± 0,19	0,22 ± 0,03		
18	7	2,79 ± 0,48	1,28 ± 0,34	n. meßbar	4,07 ± 0,61	0,47 ± 0,15		
19	8	5,15 ± 0,3	1,4 ± 0,22	n. meßbar	4,55 ± 0,48	0,44 ± 0,05		
20	9	5,06 ± 0,51	1,57 ± 0,16	n. meßbar	4,60 ± 0,5	0,51 ± 0,12		
21	10	3,52 ± 0,54	1,0 ± 0,21	0,23 ± 0,15	5,67 ± 0,7	0,61 ± 0,08	6,04 ± 0,03*	
22 (Geb.)	10	4,0 ± 0,3	3,4 ± 0,15	0,55 ± 0,14	8,41 ± 0,42	0,82 ± 0,12	0,05 ± 0,08	
24	11	4,88 ± 0,51	3,71 ± 0,5	0,7 ± 0,12	9,57 ± 0,2	0,7 ± 0,14	4,87 ± 1,20	
26	8	4,85 ± 0,9	3,86 ± 0,3	0,84 ± 0,19	9,5 ± 0,76	1,01 ± 0,25	4,0 ± 1,82	
28	16	4,28 ± 0,52	4,4 ± 0,59	1,15 ± 0,26	9,83 ± 0,84	1,1 ± 0,21	4,02 ± 1,15	
30	10	4, ± 0,9	4,0 ± 0,2	1,00 ± 0,19	10,28 ± 0,28	1,4 ± 0,14	4,68 ± 1,11	
32	15	4,44 ± 0,34	5,1 ± 0,7	1,43 ± 0,22	11,87 ± 0,94	1,47 ± 0,15	5,07 ± 0,99	
34	14	4,78 ± 0,84	5,13 ± 0,65	1,37 ± 0,22	11,28 ± 1,27	1,39 ± 0,22	5,32 ± 0,66	
36	14	5,0 ± 0,31	5,41 ± 0,44	1,91 ± 0,5	12,31 ± 0,84	1,47 ± 0,11	5,24 ± 0,65	
42	16	4,22 ± 0,7	6,07 ± 0,55	1,81 ± 0,49	12,16 ± 1,15	1,91 ± 0,22	5,76 ± 1,79	
52	15	4,0 ± 0,35	5,82 ± 0,61	2,39 ± 0,71	13,1 ± 1,08	1,68 ± 0,22	5,6 ± 0,7	
62	20	4,85 ± 0,25	5,33 ± 0,46	1,27 ± 0,47	14,0 ± 0,77	1,89 ± 0,18	1,8 ± 0,21	
142	10	5,05 ± 0,2	6,2 ± 0,5	0,62 ± 0,44	16,86 ± 0,61	1,35 ± 0,18	1,74 ± 0,27	

Legende zu Tabelle 2:

Angaben der Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

U = "freies" Acetylcholin

A = "labil" gebundenes Acetylcholin

R = "stabil" gebundenes Acetylcholin

$X = \frac{A+R}{U} =$ Verhältnis des gesamtgebundenen zum
"freien" Acetylcholin

$Y = \frac{A}{R} =$ Verhältnis des "labil" zum "stabil"
gebundenen Acetylcholin

* Mittelwert aus 8 Experimenten; bei 2
Würfen war kein "stabil" gebundenes
Acetylcholin nachweisbar.

Aus diesen Befunden resultiert die s-förmige Kurve, die die Zunahme der Gesamtkonzentration wiedergibt. (Abb. 6)

In den letzten Tagen der Gestation nimmt die Anstiegs-
geschwindigkeit durch die Vermehrung des "freien" und ins-
besondere des "labil" gebundenen Acetylcholins ständig zu

und erreicht ihr Maximum während der Geburtsphase. Zu dieser

Zeit, wenn das Gehirngewicht erst ein siebentel seines

Endgewichtes ausmacht, ist die Acetylcholinkonzentration

schon halb so hoch wie nach vier Monaten. Unmittelbar nach

der Geburt verlangsamt sich die Konzentrationszunahme. Jetzt

wachsen nur noch die gebundenen Fraktionen an; dadurch werden

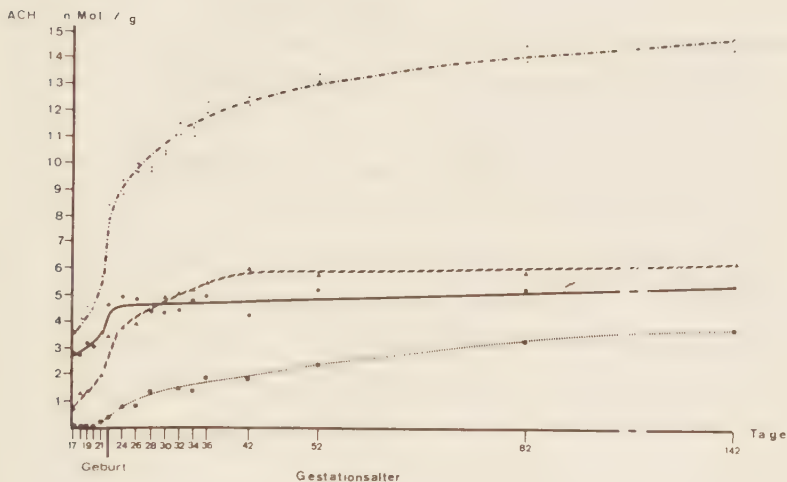
etwa drei viertel der Endkonzentration am 12. Tag erreicht.

Nach 20 Tagen trägt nur noch der "stabil" gebundene Anteil,

dessen Konzentration sich über den zweiten Lebensmonat hinaus

vermehrt, zur Erhöhung des Acetylcholinspiegels bei.

Abb. 6 Die Zunahme der Acetylcholinkonzentration während der Entwicklung des Gehirns bei der Ratte.



Legende:

Angaben der Mittelwerte in n-Mol Acetylcholin/g Hirn (Frischgewicht)

-.-.-.-.-

Gesamtmenge

—●—

"freies" Acetylcholin

---▲---

"labil" gebundenes Acetylcholin

.....■

"stabil" gebundenes Acetylcholin

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, daß es während der Entwicklung des Gehirns bei der Ratte nicht nur zu einer einfachen Anhäufung des Cholinesters kommt, sondern gleichzeitig die Bindungskapazität ständig zunimmt.

Die Bindungskapazität läßt sich durch das Verhältnis des gesamtgebundenen zum "freien" Acetylcholin ausdrücken ($"X" = \frac{A+R}{U}$ in Tabelle 2).

In der Fetalzeit und post partum bis zum 2. Tag entfällt die größte Portion vom gesamten Acetylcholin auf die "freie" Fraktion; "X" liegt unter 1. Am 4. Tag liegt etwa die Hälfte der Gesamtmenge in gespeicherter Form vor. Danach überwiegen in steigendem Umfang die gebundenen Anteile. Zwei Wochen nach der Geburt enthalten sie eineinhalb und im Erwachsenenalter fast zwei mal soviel Acetylcholin wie die "freie" Fraktion.

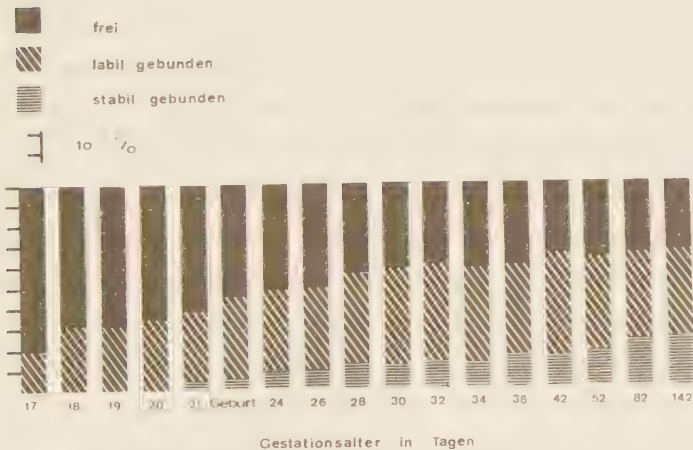
Weiterhin kommt es zu einer fortschreitenden Differenzierung der Speicherstellen, die sich an der relativen Zunahme des "stabil" gebundenen Acetylcholins gegenüber dem "labil" gebundenen Anteil erkennen läßt. ($"Y" = \frac{A}{R}$ in Tabelle 2)

Zum Zeitpunkt der Geburt unterscheidet sich der Acetylcholingehalt in der "labil" gebundenen Fraktion "A" noch um den Faktor 10 von der in der "stabil" gebundenen Fraktion "R" vorhandenen Menge. Dieser Faktor reduziert sich aber im Laufe der Zeit beträchtlich, bis er bei ausgewachsenen Ratten nur noch 1,7 beträgt.

Das "stabil" gebundene Acetylcholin bleibt während der ganzen Entwicklung die kleinste Fraktion, während der "labil" gebundene Anteil den "freien" zwischen dem 4. und 6. Lebens- tag übertrifft.

Zur Veranschaulichung ist die relative Verteilung der ein- zeln Fraktionen auf die Gesamtkonzentration in Abb. 7 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse aller Einzelbestimmungen sind im Tabellenanhang (I - XVII) niedergelegt.

Abb. 7 Prozentuale Verteilung der Acetylcholin konzen- tration in drei Fraktionen auf die Gesamt- konzentration.



Die Fraktionierung hatte in neutralem, isotonem und eiskaltem Medium zu erfolgen, um die Bindungen des Acetylcholin an das Gewebe aufrecht zu erhalten. In diesem pH-Bereich ist aber Acetylcholin weniger stabil als im schwach sauren Milieu; somit war nicht auszuschließen, daß ein Teil spontaner (nicht enzymatisch bedingter) Hydrolyse während der Aufarbeitung der Gehirne in Ringelösung unterlag. Außerdem ist die den Abbau katalysierende Acetylcholinesterase, die ihr Aktivitätsoptimum bei pH 8 besitzt, auch im neutralen Milieu noch stark wirksam (BERGMANN et al. 1958). Da "freies" Acetylcholin durch das Homogenisieren und "labil" gebundenes Acetylcholin durch die Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht werden und dadurch mit der Acetylcholinesterase in Kontakt geraten, mußte dem Extraktionsmedium Eserin zur Enzymhemmung zugesetzt werden. Aber auch das synthetisierende Ferment, die Cholinacetylase, ist in der Gewebssuspension vorhanden, kann aber durch Abkühlen auf $1-2^{\circ}\text{C}$ weitgehend inaktiviert werden. Um zu kontrollieren, ob die AcetylcholinKonzentration nach der Fraktionierung, die insgesamt länger als zwei Stunden dauerte, wirklich dem Wert entsprach, der unmittelbar nach der Dekapitation im Gehirn vorhanden war, oder ob sie sich möglicherweise durch Hydrolyse oder Synthese veränderte, wurde das gesamte Acetylcholin aus Gehirnen eines Teils der Feten sofort mit Äthanol-Eisessig extrahiert. Alle

Altersstufen von der Geburt an wurden auf diese Weise verglichen; Bei den Feten ließ sich diese Untersuchung nicht durchführen, weil die Hirnmenge von Tieren eines Wurfs nur für eine Fraktionierung ausreichte.

Die Differenzen der Mittelwerte wurden statistisch nach dem STUDENTschen t - Verfahren auf ihre Signifikanz geprüft. (Formeln zur Berechnung des t-Wertes nach WEBER (1967); die zu t gehörenden P - Werte wurden Tafeln von THER (1965) und SACHS (1968) entnommen.)

Unter Berücksichtigung der Meßgenauigkeit am biologischen Präparat konnte nur ein Unterschied als statistisch gesichert angesehen werden, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit nicht größer als 1 % war ($P < 0,01$).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Die Auswertung zeigt, daß in keinem Fall die vergleichbaren Mittelwerte signifikant voneinander abweichen. Die größte Differenz, die sich bei den Neugeborenen findet, macht weniger als 10 % aus und verändert den Kurvenverlauf nicht.

Daraus ist zu ersehen, daß sich die Gesamtkonzentration durch das relativ lange dauernde Fraktionierungsverfahren nicht wesentlich verändert.

Tabelle 3

Die Gesamtkonzentration des Acetylcholin, in. nach der Fraktionierung
und nach der Totalextraktion mit Äthanol - Eisessig.

Gestations- alter	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)		P - Wert Λ	Signifikanz
	Summe der Fraktionen	Totalextraktion in Äthanol- Eisessig		
22 (Geburt)	8,41 ± 0,42 (10)	7,69 ± 0,85 (6)	0,05	n.s.
24	9,37 ± 0,82 (11)	8,77 ± 0,8 (8)	0,2	n.s.
26	9,53 ± 0,76 (8)	9,92 ± 1,3 (5)	0,5	n.s.
28	9,83 ± 0,84 (16)	9,75 ± 0,84 (6)	0,8	n.s.
30	10,28 ± 0,28 (10)	10,21 ± 1,46 (15)	0,8	n.s.
32	11,0 ± 0,94 (13)	11,49 ± 1,18 (10)	0,3	n.s.
34	11,28 ± 1,27 (14)	11,03 ± 0,64 (7)	0,7	n.s.
36	12,31 ± 0,54 (14)	11,88 ± 0,87 (13)	0,2	n.s.
42	12,16 ± 1,15 (16)	12,37 ± 1,07 (6)	0,7	n.s.
52	13,1 ± 1,08 (13)	13,43 ± 0,85 (6)	0,5	n.s.
82	14,0 ± 0,77 (20)	14,55 ± 1,84 (13)	0,2	n.s.
142	14,86 ± 0,61 (10)	14,43 ± 1,2 (8)	0,4	n.s.

In Klammern ist die Zahl der Experimente angegeben.

2. Veränderungen der Acetylcholingehalte im Gehirn fetaler und ausgewachsener Ratten durch Pharmaka.

Beim ausgewachsenen Tier läßt sich die Acetylcholin-konzentration im Gehirn durch einige Pharmaka verändern. Ein Anstieg kann durch Hemmstoffe der Acetylcholinesterase erzielt werden oder durch Narkotika, wobei die Zunahme parallel zur Narkosetiefe verläuft. Die Applikation von Anticholinergica führt zu einer Verminderung der Acetylcholin-konzentration.

Wie die vorangehenden Untersuchungen gezeigt haben, ist das Acetylcholin-system im Gehirn fetaler Ratten nur wenig differenziert; noch in den letzten Tagen der Gestation ist der Acetylcholingehalt niedrig und besteht ganz überwiegend aus der "freien" Form, während "stabil" gebundenes Acetylcholin sich bis zum Tag vor der Geburt überhaupt nicht nachweisen läßt.

Die Beantwortung der Frage, ob und inwieweit diese Pharmaka den Acetylcholingehalt im unreifen Gehirn beeinflussen können, war die Aufgabe des zweiten Teils dieser Arbeit. Die Analysen wurden einheitlich am 20. Tag der Gestation, d.h. zwei Tage vor der Geburt vorgenommen.

Zu dieser Zeit enthält das Gehirn erst 4,63 n-Mol Ach/g Hirn, das sind ca. 31 % von der endgültigen Konzentration. Davon sind knapp 66 % "frei", der Rest ist "labil" gebunden. Weil den Feten die Pharmaka nicht direkt appliziert werden konnten, wurden sie den Muttertieren verabreicht.

a. DFP - Vergiftung.

Die AcetylcholinKonzentration wurde 1 Stunde, 24 Stunden und 9 Tage (dem 11. Tag der Gestation entsprechend, wenn sich die Vorderhirnhälften vereinigen) nach einer akuten Acetylcholinesterasevergiftung untersucht. Dazu konnte nur ein Hemmstoff mit langer Wirkungsdauer verwendet werden, der sich aufgrund seiner starken Affinität zum aktiven Zentrum der Esterase nicht kompetitiv durch den angehäuften Cholinester verdrängen läßt; somit kann das Enzym sich nur durch die physiologische Neubildung regenerieren. Wegen seiner ausgezeichneten Lipoidlöslichkeit, die ein schnelles Durchdringen der Blut - Hirnschranke gewährleistet, wurde Diisopropylfluorophosphat (DFP) gewählt. Es wurde den Muttertieren in einer Dosierung von 1,8 mg/kg Körpergewicht, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, subcutan injiziert.

aa. Symptomatik

Die ersten Vergiftungserscheinungen bei den Muttertieren zeigten sich nach etwa zehn Minuten in einer Verstärkung der Salivation. Nach 15 - 20 Minuten traten Zuckungen der Muskulatur auf, die rasch in einen generalisierten Tremor, in einigen Fällen auch in klonische Konvulsionen übergingen. Nach einer halben Stunde war das Maximum des Tremors erreicht; bis zur Tötung der Tiere nach einer Stunde

hielt er unvermindert an.

Mund und Nase füllten sich mit Sekret, die Atmung war beschleunigt, und die Zunge verfärbte sich cyanotisch. Während dieser Zeit traten in den meisten Fällen bereits Diarrhoe und Chromodakryorrhoe ("blutige Tränen") auf. Die Feten, die nach einer Stunde durch Sectio freipräpariert wurden, erschienen blau-cyanotisch verfärbt und wiesen eine stärkere motorische Aktivität auf als gleichaltrige Feten von unbehandelten Muttertieren. Muskelzuckungen konnten aber nicht beobachtet werden.

Einen Tag nach der Behandlung mit DFP-hatte der Tremor der Muttertiere aufgehört, und eine allgemeine Muskelschwäche herrschte vor. Die Tiere bewegten sich spontan kaum von der Stelle; beim Anfassen zeigten sie keine Abwehrreaktionen. Auch die Hypersekretion hatte nachgelassen; dafür bestand jetzt eine massive wässrige Diarrhoe. Die Chromodakryorrhoe hatte sich weiter ausgedehnt.

Die Feten boten die gleichen Symptome wie nach einer einstündigen Acetylcholinesterasevergiftung.

Neun Tage nach der DFP - Injektion verhielten sich die Muttertiere vollkommen unauffällig. Diese frühzeitige Applikation führte auch nicht bei den Feten zu Verhaltensänderungen oder zu äußerlich erkennbaren Mißbildungen. Hirn- und Körpergewicht waren nicht verändert.

In keinem Fall kam es zum vorzeitigen Absterben oder zur Resorption der Embryonen.

bb. Veränderungen des Acetylcholingehaltes.

Die Ergebnisse der Einzelbeobachtungen finden sich im Tabellenanhang (XVIII - XXIII). Sie sind in den Tabellen 4 und 5 und in Abb. 8 zusammengefaßt.

Wird den Muttertieren eine Stunde vor der Tötung DFP subcutan appliziert, dann kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Acetylcholkonzentration im Gehirn der Feten ($P < 0,001$):

Der Transmitter vermehrt sich um 1,66 n-Mol/g Hirn, das sind 36 % mehr als bei Feten unbehandelter Muttertiere. Von diesem Zuwachs entfallen 0,91 n-Mol/g auf die "freie" und 0,52 n-Mol/g auf die "labil" gebundene Fraktion, d.h. Acetylcholin nimmt in diesen Fraktionen im gleichen Verhältnis um etwa ein drittel zu.

Bei fünf von neun Würfen ließ sich auch "stabil" gebundenes Acetylcholin nachweisen. Da allerdings bei der geringen Konzentration die ganze Gewebsprobe zu einer Acetylcholinbestimmung eingesetzt werden mußte, konnte eine zweite Messung zur Kontrolle nicht durchgeführt werden. Dadurch ist der Aussagewert dieses Befundes begrenzt. Die Standardabweichung ist genau so groß wie die mittlere Konzentration in dieser Fraktion (0,23 n-Mol/g Hirn).

Beim Vergleich mit ausgewachsenen Ratten ergeben sich einige Unterschiede:

Bei diesen Tieren ist der Anstieg der Gesamtkonzentration

Behandlung der Mutter- tiere	Zahl der Fet.	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				X
		1'		t		
unbehandelt	9	$3,06 \pm 0,51$	$1,57 \pm 0,16$	n. meßbar	$0,04 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,10$
DFP sc. 1,8 mg/kg 1 h	9	$0,08 \pm 0,03$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
DFP sc. 1,8 mg/kg 24 h	9	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
DFP sc. 1,8 mg/kg 9 Tage	7	$0,20 \pm 0,05$	$0,00 \pm 0,00$	n. meßbar	$0,00 \pm 0,00$	$0,40 \pm 0,09$

Gestationsalter der Feten: 20 Tage

Tabelle 5

Veränderung der AcetylcholinKonzentration im Gehirn ausgewachsener Ratten durch DFP.

Behandlung	Zahl der Exp.	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)					X	Y
		U	A	R	Gesamt			
unbehandelt	10	5,05 ± 0,2	6,2 ± 0,5	3,62 ± 0,44	14,86 ± 0,61		1,95 ± 0,18	1,74 ± 0,27
DFP sc. 1,8 mg/kg 1 h	6	**** 10,42 ± 1,55	**** 8,62 ± 0,95	** 4,54 ± 0,85	**** 23,58 ± 1,75		1,29 ± 0,24	1,95 ± 0,38
DFP sc. 1,8 mg/kg 24 h	7	5,21 ± 0,5	6,41 ± 0,55	3,92 ± 0,45	15,54 ± 0,52		2,01 ± 0,32	1,65 ± 0,22
DFP sc. 1,8 mg/kg 9 Tage	10	4,96 ± 0,6	6,20 ± 0,36	3,46 ± 0,4	14,65 ± 0,87		1,97 ± 0,21	1,83 ± 0,27

Legende zu Tabelle 4 und 5:

Gestationsalter der Feten:		20 Tage
Gestationsalter der ausgewachsenen Tiere:		142 Tage
U	=	"freies" Acetylcholin
A	=	"labil" gebundenes Acetylcholin
R	=	"Stabil" gebundenes Acetylcholin
X	= $\frac{A+R}{U}$	= Verhältnis des gebundenen zum "freien" Acetylcholin
Y	= $\frac{A}{R}$	= Verhältnis des "labil" gebundenen Acetylcholins zum "stabil" gebundenen Anteil

Statistische Auswertung nach dem t - Verfahren:

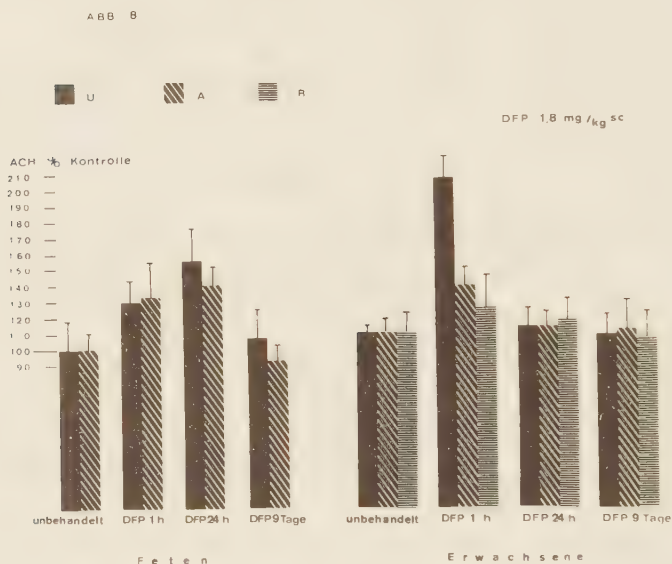
*	nicht berücksichtigt, da Standardabweichung größer oder gleich dem Mittelwert
*	$P < 0,02$
**	$P < 0,01$
***	$P < 0,001$
****	$P < 0,0001$

Alle nicht markierten Acetylcholinwerte unterscheiden sich nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollen.

um fast 60 % ausgeprägter als bei den Feten. Dabei vermehrt sich mit einem Zuwachs von über 100 % bei weitem der "freie" Anteil am stärksten. "Labil" gebundenes Acetylcholin nimmt um rund 39 % und das "stabil" gebundene um 25 % zu. Damit verringert sich die Relation dieser Fraktionen zum "freien" Acetylcholin von 1,95 : 1 auf 1,25 : 1 .

24 Stunden nach der Applikation von DFP hat sich der Acetylcholinspiegel bei den ausgewachsenen Tieren bereits

Abb. 8 Die Zunahme der AcetylcholinKonzentration im Gehirn nach Vergiftung der Acetylcholinesterase durch DFP.



Legende: Acetylcholinwerte der unbehandelten Tiere: 100 %

U = "freies" Acetylcholin

A = "labil" gebundenes Acetylcholin

R = "stabil" gebundenes Acetylcholin
 ("Stabil" gebundenes Acetylcholin, das bei einigen Würfen 1 u. 24 Stunden nach der DFP - Behandlung auftrat, wurde in der Abb. nicht berücksichtigt, weil die Standardabweichung dem Mittelwert gleich war oder überstieg.

Gestationsalter der Feten: 20 Tage

Gestationsalter der ausgewachsenen Tiere: 142 Tage

wieder normalisiert, obwohl die Acetylcholinesterase noch zum größten Teil gehemmt ist. Auch die Verteilung auf die einzelnen Fraktionen ist gegenüber den Kontrollen nicht verändert.

Im Gegensatz dazu steigt Acetylcholin im fetalen Gehirn noch um weitere 0,77 n-Mol/g bis auf 150 % der Norm. Dieser erneute Zuwachs ist jetzt ausschließlich durch die Vermehrung im "freien" Anteil auf nunmehr 155 % bedingt. Die Erhöhung in der "labil" gebundenen Fraktion bleibt dagegen nahezu stationär, und "stabil" gebundenes Acetylcholin findet sich nur noch bei einem von neun Würfen.

Wird DFP schon am 11. Tag der Tragzeit injiziert und am 20. Tag die AcetylcholinKonzentration bestimmt, so ist kein Unterschied mehr zu den Kontrollen festzustellen.

cc. Die Hemmung der Acetylcholinesteraseaktivität.

Der Grad der Acetylcholinesterasehemmung in den Gehirnen der Muttertiere und der Feten nach der Vergiftung mit DFP ist aus Tabelle 6 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Einzelmessungen finden sich im Tabellenanhang (XXIV - XXXI). Ungehemmt spaltet die Acetylcholinesterase im Gehirn der Muttertiere im Mittel ca. 10 n-Mol Acetylcholin/mg Hirn (Frischgewicht) in der Minute. Eine Stunde nach subcutaner

DFP - Applikation , wenn das Maximum der Enzyymblockade erreicht ist, findet sich ein Aktivitätsverlust von durchschnittlich 96 %. Die Vergiftung wirkt sich ebenfalls auf die bei den Feten schon vorhandene Acetylcholinesterase aus. Ihre Aktivität ist zwei Tage vor der Geburt auch normalerweise gering: Sie kann nur 0,35 n-Mol Ach/mg Hirn/min. hydrolisieren, das entspricht 3,5 % der Aktivität, die sich bei den Muttertieren findet.

Eine Stunde nach der DFP - Injektion läßt sich bei 7 von 10 Würfen überhaupt keine Enzymtätigkeit mehr nachweisen. Drei Würfe besaßen noch eine Aktivität von 25, 30 bzw. 50 %. Dennoch war der Acetylcholingehalt im gleichen Umfang gesteigert wie bei den Feten, die keine Esteraseaktivität aufwiesen.

24 Stunden nach der DFP - Gabe, wenn sich die Acetylcholin-konzentration bei den ausgewachsenen Ratten wieder auf den Normalwert reduziert hat, ist die Acetylcholinesterase noch zu 91 % gehemmt. Bei den Feten war sie bei 6 von 9 Würfen vollständig blockiert; nur bei drei Würfen zeigte sich noch eine um mindestens die Hälfte verminderte Aktivität.

Nach der Acetylchol esterasevergiftung in der Mitte der Tragzeit hat sich bei den Muttertieren das Enzym bis zum 20. Tag erst zur Hälfte regeneriert; dagegen läßt sich bei den Feten eine Aktivität nachweisen, die doppelt so hoch ist wie die ursprünglich vorhandene.

Tabelle 6

Hemmung der Acetylcholinesteraseaktivität im Gehirn durch DFP.

Behandlung der Muttertiere: 1,8 mg DFP/kg s.c.

Zeit nach der Injektion	Zahl der Experimente	Acetylcholinesteraseaktivität (n-Mol ACh / g Gehirngewebe / min)	Streuung in Prozent
Mütter	10	$0,08 \pm 0,6$	--
Feten (Kontrollen)	10	$0,35 \pm 0,2$	--
Mütter	10	$0,33 \pm 0,15$	96
Feten	10 *	$0,019 \pm 0,057$	99
DFP 1 h			
Mütter	10	$0,93 \pm 0,30$	99,7
Feten	9 **	$0,354 \pm 0,085$	84,6
DFP 24 h			
Mütter	10	$5,01 \pm 0,51$	49,8
Feten	7	$0,68 \pm 0,09$	--
DFP 9 Tage			

Die Aktivität der Acetylcholinesterase ist in n-Mol Acetylcholin angegeben, die pro mg Hirn (Frischgewebe) in der Minute zu Essigsäure und Cholin gespalten werden. Das Gestationsalter der Feten betrug 20 Tage.

* Nur bei drei Würfen ließ sich noch eine Enzymaktivität nachweisen.

** Eine Enzymaktivität ließ sich ebenfalls nur bei drei Würfen messen.

b. Urethannarkose

Als Narkotikum diente der Äthylester der Carbaminsäure, das Urethan, das eine gleichmäßig tiefe Narkose über viele Stunden herbeiführt. Es wurde den Muttertieren in einer Dosierung von 1,5 g/kg Körpergewicht in wässriger Lösung intraperitoneal injiziert.

aa. Symptomatik

Nach der Injektion verhielten sich die Tiere zunächst unauffällig. Nach 3 - 5 Minuten wurden sie mehr und mehr ataktisch in ihren Bewegungen. Dann geriet zuerst der Hinterkörper in Seitenlage und wurde beim Laufen nachgezogen, während der Vorderkörper und der Kopf noch aufrecht gehalten werden konnten. Kurze Zeit später kamen auch der Vorderkörper und der Kopf in Seitenlage, und die Tiere blieben liegen. Die Einleitungsphase dauerte höchstens acht Minuten und verlief ohne ausgeprägte Zeichen eines Excitationsstadiums. In der Folgezeit war die Atmung regelmäßig. Es herrschte vollkommene Analgesie. Der Cornealreflex blieb auslösbar.

Nach genau einer Stunde wurden die Muttertiere durch Nackenschlag getötet und die Sectio zur Freilegung der Feten durchgeführt, um gleiche Bedingungen wie bei den wachen Tieren zu schaffen.

Die Feten wiesen ein deutlich blaß - cyanotisches Haut-

kolorit auf und machten einen schlaffen Eindruck. Die Streckung des Rumpfes nach Lösen der Eihäute blieb fast immer aus, und spontane Körperbewegungen waren spärlich. Kräftig waren dagegen die Atembewegungen.

bb. Veränderung des Acetylcholingehaltes

Eine Urethannarkose trächtiger Ratten führt bei den Feten zu einem statistisch hoch signifikanten Anstieg der Acetylcholinkonzentration im Gehirn ($P < 0,0001$). Die Erhöhung betrifft vor allem die Fraktion, die zu dieser Zeit auch normalerweise am größten ist, nämlich das "freie" Acetylcholin; es vermehrt sich um $1,4 \text{ n-Mol/g}$ oder 46% .

Das steht im Gegensatz zur Veränderung, die bei ausgewachsenen Ratten auftritt. Bei ihnen ist der "freie" Anteil mit 11% am wenigsten und statistisch nicht signifikant erhöht ($P < 0,1$). Vielmehr kommt es hier vor allem zum Anstieg in den gebundenen Fraktionen; "labil" gebundenes Acetylcholin vermehrt sich um 31% , die "stabil" gebundene Fraktion um 38% .

In ähnlicher Relation wie bei den ausgewachsenen Tieren reichert sich Acetylcholin in der "labil" gebundenen Form um 33% auch bei den Feten an ($0,51 \text{ n-Mol/g}$).

"Stabil" gebundenes Acetylcholin findet sich nur bei einem von acht untersuchten Würfen in einer Konzentration von $0,49 \text{ n-Mol/g}$. Dabei ist es wiederum fraglich, ob dieser

Tabelle 7

Veränderung der Gehalte an freies Acetylcholin und gebundenes Acetylcholin durch Urethan.

Behandlung der Mutter- tiere	Zahl der Exp.	Acetylcholin n-Mole, g Hinn (Frischgewicht)				λ
		U	A	R	Gesamt	
unbehandelt	9	$3,06 \pm 0,51$	$1,57 \pm 0,16$	n. meßbar	$4,64 \pm 0,67$	$0,71 \pm 0,12$
Urethan ip. $1,5 \text{ g}/\text{kg}$ 4 h	9	$4,40 \pm 0,62$ ****	$2,08 \pm 0,32$ ++++	$0,06 \pm 0,17$	$6,48 \pm 0,81$ *****	$0,40 \pm 0,02$

Gestationsalter der Feten: 20 Tage

U = "freies" Acetylcholin

A = "labil" gebundenes Acetylcholin

R = "stabil" gebundenes Acetylcholin

X = $\frac{A+R}{U}$ = Verhältnis des gebundenen zum "freien" Acetylcholin.

Statistische Auswertung nach dem t- Verfahren:

* nicht berücksichtigt, da Standardabweichung größer als der Mittelwert

**** $P < 0,0001$

alle nicht markierten Werte unterscheiden sich nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollen

Tabelle 8

Veränderung der AcetylcholinKonzentration im Gehirn ausgewachsener Ratten durch Urethan.

Behandlung	Zahl der Exp.	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)					X	Y
		U	A	R	Gesamt			
unbehandelt	10	$5,05 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,5$	$3,63 \pm 0,44$	$14,86 \pm 0,61$		$1,95 \pm 0,18$	$1,74 \pm 0,27$
Urethan ip. 1,5 g/kg 1 h	10	$5,58 \pm 0,85$	$8,14 \pm 0,8$	$4,09 \pm 0,55$	$18,71 \pm 1,57$	****	$2,4 \pm 0,37$	$1,64 \pm 0,2$

Gestationsalter der Tiere: 142 Tage

U = "freies" Acetylcholin

A = "labil" gebundenes Acetylcholin

R = "stabil" gebundenes Acetylcholin

X = $\frac{A+R}{U}$ = Verhältnis des gebundenen zum "freien" Acetylcholin

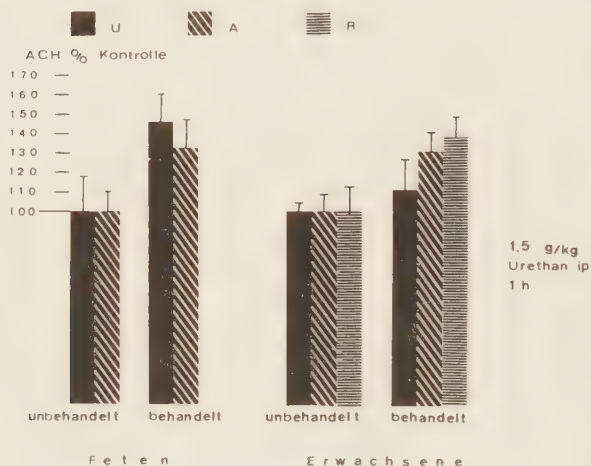
Y = $\frac{A}{R}$ = Verhältnis des "labil" gebundenen zum "stabil" gebundenen Acetylcholin.

Statistische Auswertung nach dem t- Verfahren

**** P < 0,0001

alle nicht markierten Acetylcholinwerte unterscheiden sich nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollen.

Abb. 9 Die Zunahme der Acetylcholinkonzentration im Gehirn während einer Urethannarkose.



Legende: Acetylcholinwerte der unbehandelten Tiere = 100 %

U = "freies" Acetylcholin

A = "labil" gebundenes Acetylcholin

R = "stabil" gebundenes Acetylcholin

("stabil" gebundenes Acetylcholin, daß bei einem Wurf während der Narkose auftrat, wurde in der Abb. nicht berücksichtigt.)

Gestationsalter der Feten: 20 Tage

Gestationsalter der ausgewachsenen Tiere: 142 Tage

Befund bewertet werden kann, da eine Kontrollmessung nicht durchgeführt werden konnte. Während sich bei ausgewachsenen Ratten in der Narkose das Verhältnis der Fraktionen zugunsten

des gebundenen Acetylcholins verschiebt, ändern sich die Relationen bei den Feten durch die stärkere Zunahme auch im "freien" Anteil nicht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und 8 und in der Abbildung 9 zusammengefaßt. Alle Einzelmessungen sind im Tabellenanhang (XXXII u. XXXIII) wiedergegeben.

c. Atropinwirkungen

Als Cholinolytikum wurde Atropin als spezifischer Antagonist der muscarinartigen Wirkungen des Acetylcholins gewählt.

Es wurde den Muttertieren in hoher Dosierung (25 mg/kg Körpergewicht), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, 15 Minuten vor der Tötung in die Schwanzvene injiziert.

aa. Symptomatik

Feten und Muttertiere verhielten sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen vollkommen unauffällig.

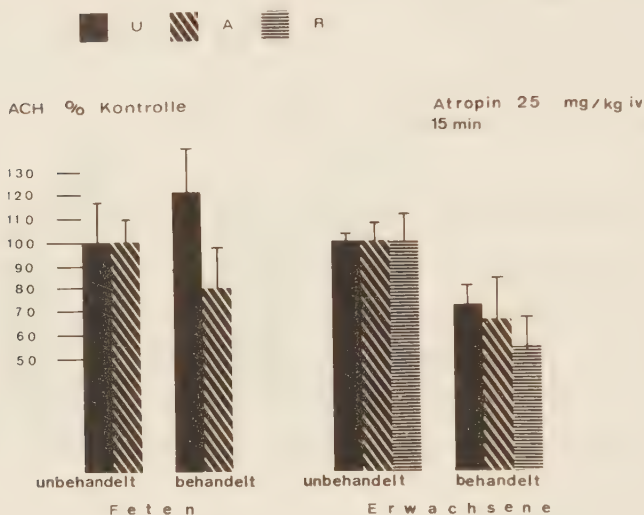
bb. Veränderung des Acetylcholingehaltes

15 Minuten nach der Atropingabe ist im Gegensatz zu den Muttertieren bei den Feten die AcetylcholinKonzentration insgesamt nicht vermindert; es findet sich sogar eine leichte Erhöhung von knapp 8 %.

In der "labil" gebundenen Fraktion kommt es jedoch zu

Abb. 10

Die Abnahme des Acetylcholingehaltes im Gehirn durch Atropin.



Legende: Acetylcholinwerte der unbehandelten Tiere = 100 %

U = "freies" Acetylcholin

A = "labil" gebundenes Acetylcholin

R = "stabil" gebundenes Acetylcholin

Gestationsalter der Feten:

20 Tage

Gestationsalter der ausgewachsenen Ratten: 142 Tage

einer Abnahme um 0,31 n-Mol/g Hirn, d.h. fast 20 %, während gleichzeitig das "freie" Acetylcholin um 0,67 n-Mol/g Hirn oder 22 % ansteigt. Die statistische Auswertung allerdings

Tabelle 8

Veränderung der AcetylcholinKonzentration im Gehirn fetaler Ratten durch Atropin.

Behandlung der Mutter- tiere	Zahl der Exp.	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				X
		U	A	R	Gesamt	
unbehandelt	9	$3,06 \pm 0,51$	$1,57 \pm 0,16$	n. meßbar	$4,64 \pm 1,5$	$2,51 \pm 0,12$
Atropin i.v. 25 mg/kg 15 min	11	$3,77 \pm 0,67$	$1,26 \pm 0,21$ **	n. meßbar	$4,09 \pm 1,65$	

Gestationsalter der Feten: 20 Tage

U = "freies" Acetylcholin
A = "labil" gebundenes Acetylcholin
R = "stabil" gebundenes Acetylcholin

X = $\frac{A+R}{U}$ = Verhältnis des gebundenen zum "freien" Acetylcholin

Statistische Auswertung nach dem t- Verfahren:

** $p < 0,01$

Alle nicht markierten Acetylcholinwerte unterscheiden sich nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollen.

Veränderung der AcetylcholinKonzentration im Gehirn ausgewachsener Ratten durch Atropin.

Behandlung	Zahl der Exp.	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)					X	Y
		U	A	R	Gesamt			
unbehandelt	10	5,05 ± 0,2	6,7 ± 0,5	3,6 ± 0,44	14,86 ± 0,61		1,95 ± 0,18	1,74 ± 0,27
Atropin iv. 25 mg/kg 15 min	11	3,61 ± 0,32	4,09 ± 0,75	1,95 ± 0,25	9,65 ± 1,00	****	1,68 ± 0,2	2,14 ± 0,5

Gestationsalter der Tiere: 142 Tage

- U = "freies" Acetylcholin
- A = "labil" gebundenes Acetylcholin
- R_i = "stabil" gebundenes Acetylcholin

X = $\frac{A+R}{U}$ = Verhältnis des gebundenen zum "freien" Acetylcholin

Y = $\frac{A}{R}$ = Verhältnis des "labil" gebundenen Acetylcholins zum "stabil" gebundenen Acetylcholin

Statistische Auswertung nach dem t- Verfahren:

**** P < 0,0001

Alle nicht markierten Acetylcholinwerte unterscheiden sich nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollen.

zeigt, daß nur die Verminderung in der Fraktion "A" als nicht zufällig betrachtet werden kann. Der P - Wert liegt unter 0,01. Dagegen ist der Zuwachs in der "freien" Fraktion nicht signifikant. Der P - Wert ist größer als 0,02.

"Stabil" gebundenes Acetylcholin läßt sich wie bei den unbehandelten Kontrollen nicht nachweisen.

Bei den vier Monate alten Ratten verringert sich die Gesamtkonzentration um 5,22 n-Mol/g Hirn bzw. 35 %. Die Abnahme betrifft alle drei Fraktionen in abgestufter Weise. Am stärksten ist das "stabil" gebundene Acetylcholin vermindert. Seine Konzentration beträgt nur noch 54 % vom Normalwert. Um 34 % nimmt das "labil" gebundene Acetylcholin ab. Am wenigsten wird der "freie" Anteil reduziert; seine Konzentration sinkt um 28 %.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9 und 10 und in der Abbildung 10 dargestellt. Im Tabellenanhang (XXXIV u. XXXV) sind alle Einzelbeobachtungen niedergelegt.

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

1. Die Zunahme des Acetylcholingehaltes in verschiedenen Fraktionen während der Gehirnentwicklung.

Das Gehirn einer ausgewachsenen Ratte enthält ca. 15 n-Mol Acetylcholin/g Hirn (Frischgewicht). Im Gehirn des Fetus finden sich fünf Tage vor der Geburt nur 3,7 n-Mol/g, beim neugeborenen Tier 8,4 n-Mol/g und am 12. Tag post partum etwa 11 n-Mol/g. Die Endkonzentration wird erst nach zwei Lebensmonaten erreicht.

CROSSLAND hat 1951 den Gesamtgehalt des Cholinesters im Gehirn bei Ratten im Alter von 1 Tag und 21 Tagen bestimmt; STONE (1955) benutzte 10 und 14 Tage alte Ratten. Die eigenen Ergebnisse, die denen STONES gleichen, stehen in gewissem Gegensatz zu CROSSLANDs Resultaten (s. Tab. 11). Er fand einen Tag nach der Geburt erst 28 % der endgültigen Konzentration, und während der ersten drei Lebenswochen nahm der Gehalt nur auf knapp die Hälfte zu. In einer späteren Arbeit mit MERRICK (1954) beschreibt CROSSLAND stark divergierende Acetylcholinwerte für drei Wochen alte Ratten. Die Autoren führten die Abweichungen auf eine Stammverschiedenheit zurück, die jedoch nur bei jungen, nicht aber bei ausgewachsenen Tieren auftraten. Da keine Angaben über das untersuchte Tiermaterial vorliegen, ist eine Nachuntersuchung nicht möglich. Von anderen sind nur

Tab. 11

Die AcetylcholinKonzentration im Gehirn heranwachsender Ratten.

Alter in Tagen (post partum)	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			Abweichung vom Eigenergebnis
	Eigene Ergebnisse	Crossland (1951)	Crossland u. Merrick (1954)	Stone (1955)
Neugeborene	8,41 $\pm$ 0,42			
1 Tag		4,12		
2 Tage	9,37 $\pm$ 0,82			
10 Tage	11,0 $\pm$ 0,94			10,1
14 Tage	12,31 $\pm$ 0,54			11,1
20 Tage	12,16 $\pm$ 1,15			
21 Tage		7,14	10,6 - 10,82 bzw. 8,24	
100 Tage		14,87		
Über 100 Tage	14,86 $\pm$ 0,61		14,73	15,3 - 18,2
Spezies	Sprague-Dawley Ratte	Wistar-Ratte	keine Angabe	keine Angabe
				+ 2,9 - + 22,4 %

relativ geringe Abweichungen im Acetylcholingehalt bei Ratten verschiedener Stämme beschrieben worden (BENNETT, CROSSLAND, KRECH u. ROSENZWEIG, 1960).

Im Hirnhomogenat mit isotoner Salzlösung läßt sich das gesamte Acetylcholin auch bei den heranwachsenden Ratten in drei Fraktionen aufteilen:

1. "Freies" Acetylcholin geht beim Homogenisieren in Lösung. Es wird von der Acetylcholinesterase des Gewebes zerstört, wenn dem Medium nicht ein Esterasehemmstoff (z.B. Eserin) zugesetzt wird. Diese Fraktion enthält bei der erwachsenen Ratte 5,05 n-Mol Ach/g Hirn. Fünf Tage vor der Geburt findet sich bereits mehr als die Hälfte von der Endkonzentration, und unmittelbar nach der Geburt ist der Endwert erreicht. WELSH und HYDE (1944) fanden bei neugeborenen Ratten erst ein viertel und bei drei Wochen alten Ratten die Hälfte der Menge "freien" Acetylcholins, die bei ausgewachsenen Tieren vorhanden war. Diese Befunde sind jedoch mit den hier mitgeteilten nicht vergleichbar, weil die Bezeichnung "freies" Acetylcholin bei WELSH und HYDE nicht klar definiert ist und vor allem Angaben über das Verhältnis zum gesamten Acetylcholingehalt fehlen.

2. Das sogenannte "Labil" gebundene Acetylcholin ist von der "freien" Fraktion durch eine Diffusionsbarriere getrennt, die sich durch die Einwirkung von Ultraschall zerstören läßt. Bei ausgewachsenen Ratten bildet das

"labil" gebundene Acetylcholin mit 6,2 n-Mol/g Hirn die größte Fraktion. Von dieser Endkonzentration findet sich im Gehirn des Feten fünf Tage vor der Geburt erst ca. ein neuntel, unmittelbar nach der Geburt jedoch bereits über die Hälfte. Der Endwert wird nach 20 Tagen erreicht.

3. "Stabil" gebundenes Acetylcholin wird durch Ultraschallwellen nicht freigesetzt. Erst durch Eiweißdenaturierung mit Äthanol-Eisessig wird es aus seiner Bindung gelöst. Diese Fraktion, die bei erwachsenen Ratten mit 3,62 n-Mol/g Hirn am kleinsten ist, entwickelt sich am langsamsten. Sie läßt sich erstmals am Tag vor der Geburt nachweisen, und das Gehirn neugeborener Ratten enthält nur ein neuntel von der endgültigen Konzentration. Am 4.-6. Tag sind es etwa 25 %, am 12.-14. Tag 50 %. Nach 30 Tagen sind 66 % entwickelt. Den Wert ausgewachsener Tiere findet man erst nach zwei Monaten.

Bei dem in dieser Arbeit angewendeten Trennverfahren läßt sich über die Lokalisation der Diffusionsbarrieren nichts aussagen. Sie entsprechen in ihren Eigenschaften jedoch den Membranen der Partikel, die das Acetylcholin ganz überwiegend speichern, nämlich den Nervenendigungen oder Synaptosomen, die eine schonende Homogenisation in physiologischen Medien als intakte Partikel überstehen (GRAY u. WHITTAKER, 1962; de ROBERTIS, RODRIGUEZ de LORES ARNAIZ, PELLEGRINO de IRALDI u. SALGANICOFF, 1962).

Schon 1964 hatten MAYNERT, LEVI und de LORENZO bei Unter-

suchungen über die subzelluläre Verteilung des Serotonins und Noradrenalins festgestellt, daß sich die Membran der Nervenendigungen durch Ultraschallwellen viel leichter zerstören ließ als die Wand der Vesikel. Daraufhin verglich MARCHBANKS (1968) die Wirkung von hyposmotischer Lösung und Ultraschallwellen auf isolierte Synaptosomenpräparationen aus Meerschweinengehirnen. Er wies nach, daß Ultraschall zwar die Synaptosomenmembran zerstörte, die synaptischen Bläschen jedoch intakt ließ, während Hypomose beide Strukturen angriff. In hypotoner Lösung oder durch Einwirkung von Ultraschall konnten 60 % des gebundenen Acetylcholins freigesetzt werden, während die restlichen 40 % in den Vesikeln gebunden waren. Zwischen beiden Kompartimenten fand in vitro kein Austausch statt. Demnach ist anzunehmen, daß die Fraktionen "A" und "R", durch Ultraschall und hochtourige Zentrifugation voneinander getrennt, dem Acetylcholin entsprechen, das aus den beiden morphologischen Kompartimenten der Nervenendigungen, nämlich ihrem Cytoplasma und den Vesikeln stammt.

Die Verteilung von synaptosomal-cytoplasmatischem und vesikulärem, oder anders ausgedrückt "labil" und "stabil" gebundenem Acetylcholin ist für verschiedene Tierspezies auch bei verschiedenen Trenntechniken ähnlich.

Bei der Maus sind nach KUROKAWA, MACHIYAMA und KATO (1963) 55 % osmotisch labil und 45 % stabil gebunden.

Beim Kaninchen gehen nach Zerstörung der Synaptosomen durch "French-Press" Technik etwas mehr als 50 % in Lösung. Die Vesikel überstehen die Behandlung und enthalten den Rest (TAKENO, NISHIO u. YANAGIYA 1969). Nach den eigenen Untersuchungen sind im Gehirn der ausgewachsenen Ratte vom gebundenen Acetylcholin 63 % durch Ultraschall freizusetzen, die übrigen 37 % sind fest gebunden. Viel unklarer ist die Herkunft des "freien" Acetylcholins. Unter normalen Bedingungen handelt es sich sicher nicht um eine wirklich freie, d.h. um die in den Extrazellulärraum abgegebene Portion, die am Rezeptor wirkt. Sie wird durch den hohen Überschuß an Acetylcholinesterase sofort hydrolysiert und kann nicht erfaßt werden. Es muß vielmehr angenommen werden, daß das "freie" Acetylcholin im lebenden Hirngewebe in einer Form vorkommt, in der es vor dem Angriff des Enzyms geschützt ist. Mehrere Möglichkeiten sind denkbar:

Erstens könnte es aus Nervenendigungen stammen, die beim Homogenisieren beschädigt werden. Zum anderen könnte es locker gebunden vorliegen und schon durch die Verdünnung, die zum Homogenisieren notwendig ist, freigesetzt werden. In dieser Form ist Acetylcholin wahrscheinlich in den Axonen enthalten; denn in den Axonen des peripheren Nervensystems findet man nach dem Homogenisieren nur "freies" und keinerlei gebundenes Acetylcholin. Allerdings ist auch

nicht ausgeschlossen, daß Acetylcholin im Axoplasma frei gelöst vorliegt. Dazu würde vorausgesetzt werden müssen, daß dort keine Acetylcholinesterase vorhanden ist. Das Enzym ist vorwiegend in den Membranen der Nervenzelle lokalisiert (de ROBERTIS, ALBERICI, RODRIGUEZ de LORES ARNAIZ u. AZCURRA 1966). Elektronenmikroskopische Befunde weisen ferner darauf hin, daß die Acetylcholinesterase an der Außenseite der Axoplasmamembran liegt (LEWIS und SHUTE 1966; BRZIN, TENNISON u. DUFFY 1966). Somit würde das im Axoplasma vorkommende Acetylcholin in der Nervenfaser gebildet werden, durch die Membran nach außen treten und dort unmittelbar hydrolisiert werden. Zur Zeit ist nicht zu entscheiden, welche der Alternativen zutreffen. Für die hier zu besprechenden Fragen ist dieses Problem jedoch nicht sehr bedeutsam.

Die Angaben in der Literatur über "Freies" Acetylcholin schwanken erheblich. So sind nach CROSSLAND und SLATER (1968) von der Gesamtmenge im Gehirn nur 8-15 % "Frei", während FONNUM und GUTTORMSEN (1969) in Übereinstimmung mit den eigenen Befunden ca. ein drittel im 100 000 g Überstand nach dem Homogenisieren finden.

Die Entwicklungsphasen der verschiedenen Fraktionen lassen sich mit der morphologisch erkennbaren Hirnentwicklung recht gut korrelieren. Besonders eingehend ist die histologische Differenzierung der Neurone (EAYRS und GOODHEAD 1959)

und Synapsen (AGHAJANIAN und BLOOM 1967; ARMSTRONG-JONES und JOHNSON 1969; GLEZER 1969) in der Hirnrinde der Ratte untersucht worden. Die frühe Periode der Hirnreifung ist hauptsächlich durch die Vermehrung der Nervenzellen gekennzeichnet. Bei der Ratte endet die Teilungsphase mit der Geburt. Obwohl das Gehirn zu diesem Zeitpunkt erst 15 % seines endgültigen Gewichts erreicht hat, ist es jetzt bereits mit der kompletten Neuronenzahl ausgestattet (McILWAIN 1966). Parallel zur Zunahme der Nervenzellen steigt die Konzentration des "freien" Acetylcholins nur bis zur Geburt an. Danach nimmt es zwar entsprechend der Vergrößerung des Gehirns zu, aber die Konzentration ändert sich nicht mehr wesentlich, d.h. die Neurone wachsen, nehmen an Zahl jedoch nicht weiter zu.

Bis zur Geburt sind die Nervenzellen allerdings wenig spezialisiert. Ihre Fortsätze sind plump und durch Extrazellulärräume getrennt. Die Identifizierung von Dendriten, Neuriten oder synaptischen Knöpfchen ist nicht möglich, da noch keine charakteristischen Merkmale der genannten Strukturen zu erkennen sind. Besonders auffällig ist das vollständige Fehlen von synaptischen Vesikeln, die ja als Speicher des "stabil" gebundenen Acetylcholins betrachtet werden. Dementsprechend ist kein "stabil" gebundenes Acetylcholin nachzuweisen.

Die Zellproliferation wird nach der Geburt vom Wachstum

der Neurone abgelöst. Gleichzeitig sprossen ihre Fortsätze in großer Zahl aus und differenzieren sich jetzt deutlich in Neuriten und Dendriten. Nunmehr werden auch die synaptischen Verknüpfungen gebildet. Sie vermehren sich auch dann noch weiter, wenn das allgemeine Wachstum bereits wieder nachläßt und die Myelinisierung zum hervorstechendsten Merkmal der morphologischen Hirnentwicklung wird. (CUZNER und DAVISON 1968).

Im Cortex erreichen die Synapsen in der vierten Lebenswoche ihre endgültige Zahl. In der Ausbildung der synaptischen Profile spiegelt sich die Zunahme des "labil" gebundenen Acetylcholins wieder. Der Anstieg der Konzentration hält solange an, bis die Bildung der Synapsen abgeschlossen ist. Auch dieser Befund weist darauf hin, daß sich das "labil" gebundene Acetylcholin in den Synapsen befindet. Die synaptischen Bläschen, charakteristischstes Kennzeichen des differenzierten Neurons, erscheinen erst nach der Geburt. Sie treten dann ziemlich rasch auf und vermehren sich entsprechend dem Reifegrad der heranwachsenden Tiere. Dabei vergrößern sie sich und nehmen unterschiedliche Formen an. In Parallele dazu vermehrt sich auch die Menge des "Stabil" gebundenen Acetylcholins in erster Linie postnatal, und zwar ziemlich kontinuierlich bis über den zweiten Lebensmonat.

Der Reifungsprozeß in den verschiedenen Hirnabschnitten

verläuft nicht mit gleicher Geschwindigkeit. AGHAJANIAN und BLOOM (1967) weisen darauf hin, daß sich der synaptische Apparat in subcortikalen Bezirken schneller entwickelt als in der Hirnrinde. So wird es auch zu Überlappungen in der Differenzierung des Acetylcholinsystems kommen, die sich jedoch bei der Pauschalbestimmung des Transmitters im ganzen Gehirn nicht erkennen lassen.

Eine sprunghafte Vermehrung der AcetylcholinKonzentration erfolgt am Tage der Geburt. Sie kommt in erster Linie durch die Zunahme des "freien" und "labil" gebundenen Acetylcholins zustande. Über den Mechanismus dieses steilen Anstiegs ist nichts bekannt. Auffällige Konzentrationsänderungen während der Geburtsphase sind bei der Ratte auch für biogene Amine beschrieben worden, die als Neurotransmitter in Frage kommen. So ist nach KARKI, KUNTZMAN und BRODY (1962) Noradrenalin zwei Tage vor der Geburt noch kaum nachweisbar; unmittelbar post partum finden sich dagegen bereits 20 % der Konzentration, die im ausgereiften Gehirn vorhanden ist. In der gleichen Zeit steigt Serotonin steil von 30 auf 55 % des Wertes erwachsener Tiere an. Dabei nimmt die Bindungskapazität nach der Geburt rasch zu. Nach BENNETT und GIARMAN (1965) ist der Anstieg des Serotonins in den letzten Tagen der Fetalzeit noch ausgeprägter, wenn auch auf einem niedrigeren Ausgangsniveau basierend. Wie beim Acetylcholin verlangsamt sich die Konzentrationszunahme postnatal. Während Serotonin

seine endgültige Konzentration nach etwa vier Wochen erreicht, hält die Noradrenalinvermehrung bis zur sechsten Lebenswoche an.

Ähnlich wie die Konzentrationszunahme des Acetylcholins in den gebundenen Fraktionen der Ausbildung der Nervenendigungen parallel verläuft, vermehren sich auch die zur Synthese und für die Hydrolyse notwendigen Enzyme. Die Entwicklung der Acetylcholinesterase, postnatal bei der Ratte von NACHMANSOHN (1940), ELKES und TODRICK (1955), ENDRÖCZY, HARTMANN und LISSAK (1966) sowie von GOMEZ, PASQUINI, SOTO und de ROBERTIS (1970) und pränatal auch von METZLER und HUMM (1951) untersucht, zeigt bei unterschiedlichen Bestimmungsmethoden im Prinzip das gleiche Ergebnis: Danach findet sich beim 14 Tage alten Rattenfetus noch keine sicher nachweisbare Enzymaktivität im Gehirn; sie tritt erst am 16. Tag auf. Kurz nach der Geburt steigt die Aktivität steil an. Wenn die synaptische Entwicklung im Laufe der vierten Lebenswoche abschließt, werden auch die Werte ausgewachsener Tiere erreicht. Die sehr geringe Menge von Pseudocholinesterase im Gehirn, die nicht neuronalen Ursprungs ist, verändert dagegen ihre Konzentration während der Entwicklung wenig und erst sehr viel später. (ELKES und TODRICK 1955; ENDRÖCZI, HARTMANN und LISSAK 1966). Über das Verhalten der Cholinacetylase, dem synthetisierenden Ferment, liegen keine Angaben für die Ratte vor.

Sie ist jedoch bei verschiedenen anderen Spezies während der Entwicklung untersucht worden, z. B. beim Kaninchen (HEBB, 1956; McCAMAN und APRISON 1964), beim Meerschweinchen (HEBB 1956) und beim Hühnchen (BURDICK und STRITTMATTER 1965; MARCHISIO und GIACOBINI 1969). Auch dieses Enzym nimmt während der synaptischen Differenzierung zu.

Während der Ontogenese des Gehirns lassen sich also zeitliche Beziehungen zwischen der Vermehrung des Acetylcholins in seinen drei Anteilen und der Entwicklung der Überträgerstellen herstellen. Es stellt sich nun die Frage, ob sich diese Ereignisse auch mit der funktionellen Ausreifung des Gehirns korrelieren lassen. Als Parameter für den Funktionsgrad können die Aktivität des Elektroenzephalogramms und die Verhaltensmuster der heranwachsenden Tiere dienen.

Am letzten Tag der Tragzeit, wenn sich die Mehrbildung des Transmitters beschleunigt und sich vor allem erstmals "stabil" gebundenes Acetylcholin nachweisen läßt, kann beim Fetus zum ersten mal elektrische Spontanaktivität im Gehirn registriert werden (ABDEL-LATIF, BRODY und RAMAHI 1967). Das deutet darauf hin, daß zu dieser Zeit eine Reihe von Neuronen funktionell aktiv wird. Die elektrische Aktivität bleibt während der ersten postnatalen Tage jedoch unregelmäßig und ist von mehreren stillen Perioden unterbrochen; die Wellenamplitude ist

niedrig. Nach der ersten Woche bilden sich dann aber ziemlich rasch Regularität und Rhythmizität aus. Bereits zwischen dem 10. und 14. Tag unterscheidet sich das Elektrokortikogramm nicht mehr wesentlich von dem ausgewachsener Tiere (CRAIN 1952). Zu dieser Zeit finden sich im Gehirn schon drei viertel der Endkonzentration in der "labil" und etwa die Hälfte in der "stabil" gebundenen Acetylcholinfraktion. Die Zahl der Synapsen nimmt weiter zu.

Im Laufe von vier Lebenswochen entwickelt sich bei der Ratte die endgültige Verhaltensweise (TILNEY 1933). Nach 10 Tagen ist das Jungtier imstande, den Weg zur Mutter zu finden; zwischen dem 14. und 16. Tag öffnen sich die Augen. Nach 20 bis 25 Tagen beginnt die Aufnahme von Fremdnahrung, und zu dieser Zeit lassen sich Fluchtreaktionen nachweisen.

Die weitgehend parallel verlaufende Entwicklung des cholinergischen Systems, der synaptischen Verbindungen, der elektrischen Aktivität des Gehirns und der Entstehung differenzierterer Verhaltensmuster ergibt einen Hinweis darauf, daß Acetylcholin für die Funktion des Gehirns von wesentlicher Bedeutung ist.

[illegible]

2. Konzentrationsänderungen in den Fraktionen des Hirn-
acetylcholins embryonaler und ausgewachsener Ratten
durch DFP, Urethan und Atropin.

Eine Behandlung trächtiger Ratten mit DFP, Urethan und Atropin als Substanzen, die auf verschiedene Weise in den Stoffwechsel des Acetylcholins eingreifen, führt auch im Gehirn 20 Tage alter Feten zu Veränderungen der AcetylcholinKonzentration in den einzelnen Fraktionen.

Bei Muttertieren, die mit toxischen Dosen DFP behandelt wurden, kommt es zu einer starken und langanhaltenden Hemmung der Acetylcholinesterase: Noch neun Tage nach der subcutanen Injektion von 1,8 mg/kg Körpergewicht sind ca. 50 % des Enzyms gehemmt.

Der Phosphorsäureester wirkt sich auch auf die bei den Feten schon in geringer Menge vorhandene Acetylcholinesterase aus. 1 Stunde und 24 Stunden nach der Vergiftung der Muttertiere ist bei den meisten Würfen überhaupt keine Enzymtätigkeit nachweisbar. Wird DFP schon am 11. Tag der Tragzeit gegeben, dann zeigt sich am 20. Tag keine Fermenthemmung; es findet sich im Gegenteil eine Verdoppelung der Aktivität im Vergleich zu den Feten, deren Mütter nicht behandelt wurden.

Eine Hemmung war zwar nicht zu erwarten, weil die Acetylcholinesterase in der embryonalen Anlage des Zentralnervensystems 11 Tage nach der Konzeption noch nicht in meßbaren Mengen vorhanden ist. Die starke Erhöhung überrascht jedoch.

Sie deutet darauf hin, daß das in der Mitte der Tragzeit applizierte DFP über einen noch unbekannten Mechanismus die Enzymsynthese beeinflussen kann. Ob die Entwicklung des cholinergischen Systems dadurch gestört wird, geht aus diesem Befund allerdings nicht hervor; denn auf die AcetylcholinKonzentration und -Verteilung auf die Fraktionen wirkt sich die erhöhte Enzymaktivität nicht aus. Durch die Enzymhemmung kommt es zu einem verminderten Abbau des freigesetzten Acetylcholins. Das erklärt den dominierenden Anstieg der Konzentration in der "freien" Fraktion. Er ist nach einer Stunde mit über 100 % bei ausgewachsenen Ratten sehr viel größer als bei den Feten, bei denen "freies" Acetylcholin nur um 30 % zunimmt. Da anzunehmen ist, daß sich der Teil des Acetylcholins, der nun nicht mehr sofort hydrolysiert werden kann, außerhalb der Nervenzelle im synaptischen Spalt befindet, verändert sich der Charakter der "freien" Fraktion: Zur ursprünglichen Fraktion "U" kommt die Acetylcholinmenge hinzu, die - bei unbeeinträchtigter Freisetzung - langsamer abgebaut wird. Die Freisetzung ist abhängig von der elektrischen Aktivität des Gehirns (PHILLIS und CHONG 1965; COLLIER und MITCHELL 1967; SZERB 1967). Da bei fetalen Ratten Hirnströme erstmals unmittelbar vor der Geburt auftreten, läßt die geringere Acetylcholinvermehrung eine Stunde nach der Acetylcholinesterasevergiftung auf eine kleinere Freisetzungs-

rate des Transmitters bei den Feten schließen.

Anders als bei den ausgewachsenen Ratten hält die Acetylcholinvermehrung bei den Feten über 24 Stunden an. Nach dieser Zeit ist bei den Feten die Konzentration im "freien" Anteil weiter angestiegen, während sich der Acetylcholin Spiegel bei den erwachsenen Tieren bereits wieder normalisiert hat und sich die Verteilung auf die Fraktionen nicht mehr von der unbehandelten Kontrollen unterscheidet. Nach FONNUM und GUTTORMSEN (1969) stellt sich die Konzentration innerhalb von 16 Stunden wieder auf ihren Normalwert ein. Bei der ausgewachsenen Ratte sind Mechanismen beschrieben, die den Acetylcholingehalt im Gehirn kontrollieren. KAITA und GOLDBERG (1969) vermuten, daß eine Art negative Rückkoppelung die Syntheserate des Acetylcholins regelt, da die Aktivität der Cholinacetyltransferase mit zunehmender Konzentration des Cholinesters (in vitro) gehemmt wird. Bei den Feten, bei denen die Acetylcholin Konzentration auch physiologischerweise immer schneller zunimmt, scheinen solche Regulationsmechanismen noch nicht ausgebildet zu sein.

Nicht nur der "freie", sondern auch die gebundenen Anteile beteiligen sich an der Acetylcholinvermehrung durch DFP. Nach einer Stunde hat das "labil" gebundene Acetylcholin etwa gleich stark bei den Feten und ausgewachsenen Tieren zugenommen; der "stabil" gebundene Anteil vermehrt sich

weniger. Nach POLAK (1967) läßt sich die Zunahme in diesen Fraktionen durch eine Rückverteilung des außen angehäuften Transmitters in die nervösen Strukturen erklären. MARCHBANKS (1968) konnte in Analogie dazu nachweisen, daß isolierte Synaptosomen exogenes Acetylcholin aufnehmen können.

Eine Urethannarkose der Muttertiere führt im Gehirn der Feten zu einer stärkeren Erhöhung der AcetylcholinKonzentration als bei ausgewachsenen Tieren. Das steht in Einklang mit den Befunden von CROSSLAND und MERRICK (1954), nach denen die Zunahme bei jungen Tieren sehr viel ausgeprägter ist als bei erwachsenen.

Die Erhöhung findet bei den vier Monate alten Ratten vor allem in den gebundenen Fraktionen statt. Dadurch wird die Vermutung bestätigt, daß die Narkose zu einer verminderten Abgabe des Acetylcholins führt. Bei Durchspülung von Rindengewebe (Mac INTOSH und OBORIN 1953; MITCHELL 1963) oder Ventrikeldurchströmungen (BELESLIN und POLAK 1965) wird in der Narkose weniger Acetylcholin freigesetzt. Die Synthese ist nicht vermehrt (BEANI, BIANCHI, MEGGAZZINI, BALLOTTI und BERNARDI 1968) und der Abbau nicht gehemmt (DROSS und KEWITZ 1968).

Die Daten verschiedener Untersucher bieten kein ganz einheitliches Bild (s. Tabelle 13). Besonders fällt auf, daß einige Autoren auch eine deutliche Erhöhung der Konzentration im "freien" Anteil feststellten. Eine Reihe unter-

Tabelle 13

Veränderungen des Acetylcholingehaltes im Gehirn während der Narkose

$\uparrow$ = signifikanter Anstieg, $\uparrow \dots \uparrow$ = nicht signifikanter Anstieg, $\rightarrow$ = keine Veränderung

Untersucher	Narkotikum	Veränderung der Acetylcholkonzentration			Spezies
		im "freien" Anteil	im "labil" gebundenen Anteil	im "stabil" gebundenen Anteil	
Eigene Ergebnisse	Urethan	$\uparrow \dots \uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	Sprague-Dawley Ratte
Kewitz u. Pleul (1968)	Urethan	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	Sprague-Dawley Ratte
Crossland u. Slater (1968)	Urethan Chloralhydrat Äther Pentobarbital	$\uparrow \dots \uparrow$ $\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$ $\uparrow$	Wistar-Ratte
Kurokawa et al. (1963)	Pentobarbital	nicht untersucht	$\uparrow$	$\uparrow$	Maus
Beani et al. (1968)	Thiopental	$\uparrow$	$\uparrow$	$\rightarrow$	Meerschweinchen

schiedlicher Faktoren wie Tierspezies, Fraktionierungsmethoden, Dauer der Narkose und Wahl des Narkotikums lassen allerdings nur bedingt einen Vergleich zu. So finden z.B. CROSSLAND und SLATER (1968) nur nach Pentobarbital, nicht jedoch nach Urethan oder Äther eine signifikante Vermehrung des "freien" Acetylcholins.

Im Gegensatz zu den ausgewachsenen Tieren reagieren die Feten mit einer deutlich stärkeren Zunahme des "freien" Acetylcholins gegenüber dem "labil" gebundenen Anteil. Demnach kann die Erhöhung der Konzentration, deren Umfang von der Narkosetiefe bestimmt wird, nicht von der Ausbildung von Synapsen, die zu dieser Zeit nur in spärlicher Zahl vorhanden sind, abhängig sein. Bis jetzt ist nicht geklärt, ob die Acetylcholinvermehrung Ursache oder Folge der Narkose ist.

Werden den Muttertieren 15 Minuten vor der Tötung hohe Dosen Atropin in die Schwanzvene injiziert, so reagieren die Feten ähnlich wie erwachsene Ratten mit einer signifikanten Senkung des gebundenen Acetylcholins. Gleichzeitig kommt es jedoch zu einem Anstieg in der "freien" Fraktion, sodaß sich keine Veränderungen im Gesamtgehalt ergeben. Bei ausgewachsenen Tieren vermindern sich alle drei Fraktionen in abgestufter Reihenfolge. Der "stabil" gebundene Anteil nimmt dabei am stärksten ab, ein Befund, der auch von KEWITZ und PLEUL (1968) und von BEANI und Mitarbeitern (1968) (für Scopolamin) erhoben wurde.

Da Cholinolytika den Abbau des Transmitters nicht verstärken oder die Synthese hemmen (GIARMAN und PEPEU 1964), muß sich die Konzentration auf andere Weise ändern. Durchspülungen der Hirnrinde und -Ventrikel zeigen, daß intravenöse oder lokale Gaben von Atropin oder anderen Anticholinergika eine starke Steigerung der Freisetzungsrates des Acetylcholins bewirken (MITCHELL 1963; SZERB 1964; POLAK 1965). Da die Verminderung vor allem die gebundenen Fraktionen betrifft, ist als Mechanismus eine Herabsetzung der Speicherkapazität anzunehmen. Entweder kommt es durch Atropin zu einer verstärkten Abgabe aus den Depots, oder neugebildetes Acetylcholin wird in vermindertem Umfang in sie aufgenommen oder beides. Die Abnahme des gebundenen Acetylcholins im fetalen Gehirn weist darauf hin, daß Atropin auf die beim Feten vorhandenen Speicher die gleiche Wirkung hat.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß die geprüften Pharmaka erheblich in das noch undifferenzierte cholinergische System des Gehirns eingreifen. Dabei fehlen den Feten im Unterschied zu den ausgewachsenen Tieren offensichtlich noch homöostatische Mechanismen, die, wie besonders die Versuche zur Acetylcholinesterasehemmung aufgezeigt haben, Störungen im Enzymsystem ziemlich rasch kompensieren können.

Die Befunde lassen allerdings nicht erkennen, daß die Entwicklung des cholinergischen Systems durch eine akute

Wirkung dieser Stoffe nachhaltig beeinträchtigt wird.
Genaue Aufschlüsse über die Regulation der Entwicklung
müssen daher weiteren Experimenten vorbehalten bleiben,
in denen die Auswirkungen einer ständigen Behandlung
mit den genannten Pharmaka untersucht wird.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Analysen der AcetylcholinKonzentration während der Ontogenese des Gehirns sollten Einblicke in die Entwicklung des cholinergischen Systems gewonnen werden. Die Untersuchungen wurden an Ratten im Gestationsalter von 17 - 142 Tagen durchgeführt. Dazu wurde das Hirnacetylcholin in drei Fraktionen aufgeteilt:

1. "Freies" Acetylcholin befindet sich im 100 000 g Überstand eines Homogenats mit eserinhaltiger Ringerlösung.
2. "Labil" gebundenes Acetylcholin läßt sich durch Ultraschallwellen aus den Gewebsfragmenten freisetzen.
3. "Stabil" gebundenes Acetylcholin kann erst nach Eiweißdenaturierung mit Äthanol-Eisessig aus seinen Bindungen gelöst werden.

Im Gehirn einer ausgewachsenen Ratte finden sich 5,05 n-Mol/g "freies", 6,2 n-Mol/g "labil" gebundenes und 3,62 n-Mol/g "stabil" gebundenes Acetylcholin.

Die Fraktionen entwickeln sich mit verschiedener Geschwindigkeit. Fünf Tage vor der Geburt beträgt die AcetylcholinKonzentration im Gehirn erst 24 % der beim erwachsenen Tier vorhandenen Konzentration. Davon sind 80 % "freies", der Rest "labil" gebundenes Acetylcholin; die "stabil" gebundene Fraktion ist noch nicht vorhanden. Bis zur Geburt steigen die Konzentrationen mit zunehmender Geschwindigkeit an. "Freies" Acetylcholin erreicht seine endgültige Konzentration unmittelbar nach der Geburt, der "Labil" gebundene Anteil um den 20. Tag p.p.;

"stabil" gebundenes Acetylcholin erreicht seine Endkonzentration erst beim Abschluß des Hirnwachstums.

Die Entwicklung der gebundenen Acetylcholinfraktionen verläuft parallel zur synaptischen Differenzierung des Neuropils.

Cholinesterasehemmstoffe, Narkotika und Anticholinergika, die bei ausgewachsenen Tieren Veränderungen der AcetylcholinKonzentration in den verschiedenen Anteilen herbeiführen, wirken sich auch auf 20 Tage alte Feten aus.

Wird den Muttertieren eine Stunde vor der Tötung DFP (1,8 mg/kg sc.) appliziert, dann findet sich im Gehirn der Feten neben der Abnahme der Acetylcholinesteraseaktivität ein Anstieg der AcetylcholinKonzentration um 35 %. "Freies" und "labil" gebundenes Acetylcholin vermehren sich etwa im gleichen Verhältnis um ein Drittel. Appliziert man das DFP 24 Stunden vorher, so ist die Konzentration bei ausgewachsenen Tieren nicht mehr erhöht; dagegen nimmt bei den Feten "freies" Acetylcholin noch weiter zu. Wird das DFP schon 11 Tage nach der Konzeption injiziert und am 20. Tag die AcetylcholinKonzentration bestimmt, dann ist kein Unterschied zu den unbehandelten Tieren festzustellen. Die Acetylcholinesteraseaktivität ist dagegen doppelt so hoch.

Während einer Urethannarkose (1,5g/kg ip.) steigt der Acetylcholingehalt im Gehirn der Feten um 46 %. Dabei erhöht sich vor allem die Konzentration im "freien" Anteil, während bei ausgewachsenen Tieren die Erhöhung überwiegend das gebundene Acetylcholin betrifft.

Nach 25 mg Atropin /kg iv. ist im Gegensatz zu den erwachsenen Tieren bei den Feten die Gesamtkonzentration nicht vermindert. Jedoch findet sich eine Abnahme von 20 % in der "labil" gebundenen Acetylcholinfraktion, die durch eine gleichzeitige Zunahme des "freien" Anteils verdeckt wird.

Damit ist erwiesen, daß diese Pharmaka auch erheblich in das noch undifferenzierte cholinergische System des Gehirns eingreifen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. A.A. ABDEL-LATIF, J. BRODY u. H. RAMAHI (1967)
"Studies on sodium-potassium adenosine triphosphatase of the nerve endings and appearance of electrical activity in developing rat brain."
J. Neurochem. 14, 1133-1141.
2. G.K. AGHAJANIAN u. F.E. BLOOM (1967)
"The formation of synaptic junctions in developing rat brain: A quantitative electron microscopic study."
Brain Research 6, 716-727.
3. P. ANDERSON u. D.R. CURTIS (1964)
"The excitation of thalamic neurons by acetylcholine."
Acta Physiol. Scand. 61, 85-99.
4. M.A. ARMSTRONG-JONES u. F.R. JOHNSON (1969)
"Postnatal development of synapses in the cerebral cortex of the rat."
J. Anat. 104, 590.
5. L. BEANI, C. BIANCHI u. P. MEGGAZZINI (1964)
"Regional changes of acetylcholine and choline acetylase activity in the guinea pig's brain after scopolamine."
Experientia 20, 677-679.
6. L. BEANI, C. BIANCHI, P. MEGGAZZINI u. L. BALLOTTI (1968)
"Drug induced changes in free, labile and stable acetylcholine of guinea-pig brain."
Biochem. Pharmacol. 18, 1315-1324.
7. BELLAMY, D. (1959)
"The distribution of bound acetylcholine and choline acetylase in rat and pigeon brain."
Biochem. J. 72, 165-168.
8. D. BELESLIN u. R.L. POLAK (1965)
"Depression by morphine and chloralose of acetylcholine release from the cat's brain."
J. Physiol. (London) 177, 411-419.

9. E.L. BENNETT, J. CROSSLAND, D. KRECH u. M.R. ROSENZWEIG (1960)
"Strain differences in acetylcholine concentration in the brain of the rat."
Nature 187, 787-788
10. D.S. BENNETT u. N.J. GIARMAN (1965)
"Schedule of appearance of 5-hydroxy-tryptamine (serotonin) and associated enzymes in the developing brain of the rat."
J. Neurochem. 12, 911-918.
11. G.A. BENTLEY u. F.A. SHAW (1952)
"The separation and assay of acetylcholine in tissue extracts."
J. Pharmacol. exp. Ther. 106, 193-199.
12. F. BERGMANN, S.S. RIMON u. R. SEGAL (1958)
"Effect of pH on the activity of eel esterase towards different substrates."
Biochem. J. 68, 493-499.
13. BODIAN, D. (1942)
"Cytological aspects of synaptic function."
Physiol. Rev. 42, 140-162.
14. P.B. BRADLEY u. J.H. WOLSTENCROFT (1962)
"Excitation and inhibition of brain stem by noradrenaline and acetylcholine."
Nature 196, 840 und 873.
15. E. BRODKIN u. K.A.C. ELLIOTT (1953)
"Binding of acetylcholine."
Amer. J. Physiol. 174, 437-442.
16. M. BRZIN, V.M. TENNISON u. P.E. DUFFY (1966)
"Acetylcholinesterase in frog sympathetic and dorsal root ganglia."
J. Cell Biol. 31, 215-242.
17. C.J. BURDICK u. C.F. STRITTMATTER (1965)
"Appearance of biochemical components related to acetylcholine metabolism during the embryonic development of chick brain."
Arch. biochem. biophys. 109, 293-301.

18. H.C. CHANG u. J.H. GADDUM (1933)
"Choline esters in tissue extracts."
J. Physiol. (London) 79, 255-285.
19. B. COLLIER u. J.F. MITCHELL (1967)
"The central release of acetylcholine during consciousness and after brain lesions."
J. Physiol. (London) 188, 83-98.
20. S.M. CRAIN (1952)
"Development of electrical activity in the cerebral cortex of the albino rat."
Proc. Soc. exp. Biol. (NY) 81, 49-51
21. J. CROSSLAND (1951)
"The use of liquid air in the extraction of acetylcholine."
J. Physiol. (London) 114, 318-324.
22. J. CROSSLAND u. A.J. MERRICK (1954)
"The effect of anaesthesia on the acetylcholine content of brain."
J. Physiol. (London) 125, 56-66.
23. J. CROSSLAND u. P. SLATER (1968)
"The effect of some drugs on the "free" and "bound" acetylcholine content of rat brain."
Br. J. Pharmac. Chemother. 33, 42-47.
24. D.R. CURTIS u. K. KOIZUMI (1961)
"Chemical transmitter substances in the brain stem of the cat."
J. Neurophysiol. 24, 80-90.
25. D.R. CURTIS u. R.W. RYALL (1966)
"The acetylcholine receptors of Renshaw cells."
Exptl. Brain Res. 2, 66-80.
26. L. CUZNER u. A.N. DAVISON (1968)
"The lipid composition of rat brain myelin and subcellular fractions during development."
Biochem. J. 106, 29-34

27. K. DROSS (1965)
"Die wasserlöslichen Cholinverbindungen des Gehirns."
Inaug. Diss. Math. Naturwiss. Fakult. der Freien Universität Berlin.
28. K. DROSS u. H. KEWITZ (1968)
"Konzentration von Acetylcholin, Cholin und Glycerylphosphorylcholin während der Narkose und bei der DFP-Vergiftung."
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 260, 107.
29. J.T. EAYRS u. B. GOODHEAD (1959)
"Postnatal development of the cerebral cortex of the rat."
J. Anat. 93, 385-402
30. J. ELKES u. A. TODRICK (1955)
"On the development of the cholinesterases in the rat brain."
In: "Biochemistry of the developing nervous system."
Ed. H. Waelsch, Academic Press New York
pp 309-320.
31. K.A.C. ELLIOTT, R.L. SWANK u. N. HENDERSON (1950)
"Effects of anaesthetics and convulsants on acetylcholine content in brain."
Amer. J. Physiol. 162, 469-474.
32. E. ENDRÖCZI, G. HARTMANN u. K. LISSAK (1967)
"Maturation of the acetylcholine - cholinesterase system of the brain stem in the new born rat."
Acta physiol. Acad. Scient. Hungaricae Tomus 32, 307-315.
33. H.-D. FISCHER, K. WESTERMANN u. W. OELSSNER (1969)
"Regionale Verteilung von Azetylcholin im Rattenhirn und deren Beeinflussung durch Cholinomimetika und Cholinolytika."
Acta biol. med. germ. 23, 181-188.
34. F. FONNUM u. D.M. GUTTORMSEN (1969)
"Changes in acetylcholine content of rat brain by toxic doses of di-isopropyl phosphorofluoridate."
Sep. Experientia 25, 505-506.

35. J.H. GADDUM (1961)
"Substances released in nervous activity."
Proc. 1st Int. Pharmacol. Meet., Stockholm
Eds. Paton u. Lindgren, Pergamon Press
London pp 1-6
36. N.J. GIARMAN u. G. PEPEU (1964)
"The influence of centrally acting cholinolytic drugs
on brain acetylcholine levels."
Br. J. Pharmac. Chemother. 23, 123-130
37. I.I. GLEZER (1969)
"On the problem of the morphogenesis of the synaptic
apparatus in the cerebral cortex of the white rat."
Arch. anat. gist. embr. (Leningrad) 56, 77-84
38. C.J. GOMEZ, J.M. PASQUINI, E.F. SOTO u. E. de ROBERTIS (1970)
"Binding of D-(dimethyl ¹⁴C)tubocurarine, acetylcholin-
esterase and proteolipids in subcellular membranes of the
cerebral cortex of the developing rat."
J. Neurochem. 17, 1485-1492.
39. E.G. GRAY u. V.P. WHITTAKER (1962)
"The isolation of nerve endings from brain. An electron
microscopic study of cell fragments derived by homogeni-
sation and centrifugation."
J. Anat. 96, 79-88
40. C.O. HEBB (1956)
"Choline acetylase in the developing nervous system of
the rabbit and guinea pig."
J. Physiol. (London) 133, 566-570.
41. C.O. HEBB u. A. SILVER (1956)
"Choline acetylase in the central nervous system of man
and some other mammals."
J. Physiol. (London) 134, 718-728.
42. H. HERKEN u. D. NEUBERT (1953)
"Der Acetylcholingehalt des Gehirns bei verschiedenen
Funktionszuständen."
Arch. exp. Path. u. Pharmacol., 219, 223-233.

43. T. ISHII u. R.L. FRIEDE (1967)
"A comparative histochemical mapping of the distribution of acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotidediaphorase activities in the human brain."
Int. Rev. Neurobiol. 10, 231-275.
44. J. JENSEN-HOLM, H.H. LAUSEN, K. MILTHERS u. K.O. MØLLER (1959)
"Determination of the cholinesterase activity in blood and organs by automatic titration. With some observations on serious errors of the method and remarks of the photometric determination."
Acta pharmacol. et toxicol. 15, 384-394.
45. A.A. KAITA u. A.M. GOLDBERG (1969)
"Control of acetylcholine synthesis- the inhibition of choline acetyltransferase by acetylcholine."
J. Neurochem. 16, 1185-1191.
46. N. KARKI, R. KUNTZMAN u. B.B. BRODIE (1962)
"Storage, synthesis, and metabolism of monoamines in the developing brain."
J. Neurochem. 2, 53-58.
47. H. KEWITZ (1959)
"Nachweis von 4-Amino-n-butyrylcholin im Warmblütergehirn."
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 237, 308-318.
48. H. KEWITZ u. O. PLEUL (1968)
"Aufteilung des Acetylcholins im Rattenhirn in drei Fraktionen und Versuch einer funktionellen Zuordnung."
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 263, 228.
49. J.E. KIEHLSTRÖM (1966)
"Diurnal variation in the spontaneous ejaculations of the male albino rat."
Nature 209, 513-514.
50. K. KRNJEVIC u. J.W. PHILLIS (1963)
"Acetylcholine sensitive cells in the cerebral cortex."
J. Physiol. (London) 166, 296-327.
51. M. KUROKAWA, Y. MACHIYAMA u. M. KATO (1963)
"Distribution of acetylcholine in the brain during various states of activity."
J. Neurochem. 10, 341-348.

52. P.R. LEWIS u. C.C.D. SHUTE (1966)
"The distribution of cholinesterase in cholinergic neurons demonstrated with the electron microscope."
J. Cell Sci. 1, 381-390.
53. F.C. MacINTOSH u. P.E. OBORIN (1953)
"Release of acetylcholine from intact cerebral cortex."
Abstr. XIX Int. Physiol. Congr. pp 580-581.
54. F.C. MacINTOSH u. W.L.M. PERRY (1950)
"Biological estimation of acetylcholine."
Meth. med. Res. 3, 78-92
55. R.M. MARCHBANKS (1968)
"Exchangeability of radioactive acetylcholine with the bound acetylcholine of synaptosomes and synaptic vesicles."
Biochem. J. 106, 87-95.
56. P.C. MARCHISIO u. G. GIACOBINI (1969)
"Choline acetyltransferase activity in the central nervous system of the developing chick."
Brain Res. 15, 301-304.
57. E.W. MAYNERT, R. LEVI u. A.J.D. de LORENZO (1964)
"The presence of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in vesicles from disrupted nerve-ending-particles."
J. Pharmacol. 144, 385-392.
58. R.E. McCAMAN u. M.H. APRISON (1964)
"The synthetic and catabolic enzyme systems for acetylcholine and serotonin in several discrete areas of the developing rabbit brain."
Progr. in Brain Res. 2, 220-233.
59. I. McCANCE u. J.W. PHILLIS (1964)
"The action of acetylcholine on cells in the cat cerebellar cortex."
Experientia 20, 217-218.
60. H. McILWAIN (1966)
Biochemistry of the Central Nervous System. 2nd Ed.
J. u. A. Churchill Ltd, London.

61. C.J. METZLER u. D.G. HUMM (1951)
"The determination of cholinesterase activity in whole brains of developing rats."
Science 113, 382-383.
62. J.F. MITCHELL (1963)
"The spontaneous and evoked release of acetylcholine from the cerebral cortex."
J. Physiol. (London) 165, 98-116.
63. D. NACHMANSOHN (1940)
"On the physiological significance of choline esterase."
Yale J. Biol. et Med. 12, 565-589.
64. J.W. PHILLIS u. G.C. CHONG (1965)
"Acetylcholine release from the cerebral and cerebellar cortices: Its role in cortical arousal."
Nature 207, 1253-1255.
65. R.L. POLAK (1965)
"Effect of hyoscine on the output of acetylcholine in perfused cerebral ventricles of the cat."
J. Physiol. (London) 181, 317-323.
66. R.L. POLAK (1967)
"Uptake of acetylcholine by the isolated cerebral cortex of the rat."
Acta physiol. Pharmac. Neerl. 14, 505.
67. E. de ROBERTIS, M. ALBERICI, G. RODRIGUEZ de LORES ARNAIZ u. J.M. AZCURRA (1966)
"Isolation of different types of synaptic membranes from the brain cortex."
Life Sci. (Oxford) 5, 577-582.
68. E. de ROBERTIS u. H.S. BENNETT (1955)
"Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm."
J. biophys. biochem. Cytol. 1, 47-58.
69. E. de ROBERTIS, A.P. PELLEGRINO de IRALDI, G. RODRIGUEZ de LORES ARNAIZ u. J. GOMEZ (1961)
"On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles."
J. biophys. biochem. Cytol. 2, 229-235.

70. E. de ROBERTIS, A. PELLEGRINO de IRALDI, G. RODRIGUEZ de LORES ARNAIZ u. L. SALGANICOFF (1962)
"Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. I. Isolation and subcellular distribution of acetylcholine and acetylcholinesterase."
J. Neurochem. 9, 23-35.
71. E. de ROBERTIS, G. RODRIGUEZ de LORES ARNAIZ, L. SALGANICOFF, A. PELLEGRINO de IRALDI u. L.M. ZIEHER (1963)
"Isolation of synaptic vesicles and structural organization of the acetylcholine system within brain nerve endings."
J. Neurochem. 10, 225-235.
72. D. RICHTER u. J. CROSSLAND (1949)
"Variation in acetylcholine content of the brain with physiological state."
Amer. J. Physiol. 159, 247-255.
73. L. SACHS (1966)
"Statistische Auswertungsmethoden."
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
p 140.
74. G.C. SALMOIRAGHI u. F.A. STEINER (1963)
"Acetylcholine sensitivity of cat's medullary neuron."
J. Neurophysiol. 26, 581-597.
75. W.E. STONE (1955)
"Acetylcholine in brain. I. "Free", "bound", and total acetylcholine."
Arch. Biochem. 59, 181-192
76. K.T. SZABO, S.M. FREE, H.A. BIRKHEAD u. P.A. GAY (1969)
"Predictability of pregnancy from various signs of mating."
Lab. Animal Care 19, 822-825.
77. J.C. SZERB (1964)
"The effect of tertiary and quaternary atropin on cortical acetylcholine output and on the electroencephalogram in cats."
Can. J. Physiol. Pharmacol. 42, 303-314.
78. J.C. SZERB (1967)
"Cortical acetylcholine release and electroencephalographic arousal."
J. Physiol. 192, 329-343.

79. K. TAKENO, A. NISHIO u. J. YANAGIYA (1969)
"Bound acetylcholine in the nerve ending particles."
J. Neurochem. 16, 47-52.
80. L. THER (1965)
"Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung."
Wissenschaftliche Verlagsanstalt m.b.H. Stuttgart.
81. F. TILNEY (1933)
"Behaviour in relation to the development of the brain.
II. Correlation between the development of the brain
and behaviour in the albino rat from embryonic states
to maturity."
Bull. neurol. Inst. NY. 2, 352-358.
82. E. WEBER (1967)
"Grundriss der biologischen Statistik."
6. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
83. J.H. WELSH u. J.E. HYDE (1944)
"The distribution of acetylcholine in brains of rats
of different ages."
J. Neurophysiol. 7, 41-49.
84. V.P. WHITTAKER, J.A. MICHAELSON u. R.J.A. KIRKLAND (1964)
"The separation of synaptic vesicles from nerve ending
particles (synaptosomes)."
Biochem J. 20, 293-303.

VII. TABELLENANHANG

No. I - XVII	Die Entwicklung der Acetylcholinfraktionen im Gehirn.
No. XVIII - XXIII	Veränderung der Acetylcholin-konzentration im Gehirn durch DFP.
No. XXIV - XXXI	Acetylcholinesterasehemmung im Gehirn durch <u>DFP</u> .
No. XXXII - XXXIII	Veränderung der Acetylcholin-konzentration im Gehirn durch <u>Urethan</u> .
No. XXXIV - XXXV	Veränderung der Acetylcholin-konzentration im Gehirn durch <u>Atropin</u> .

Zeichenerklärung:

U	=	"freies" Acetylcholin
A	=	"labil" gebundenes Acetylcholin
R	=	"stabil" gebundenes Acetylcholin
Ach	=	Acetylcholin
((AchE))	=	Acetylcholinesteraseaktivität

Tabelle I

Fetale Ratten, Gestationsalter 17 Tage

Körpergewicht: 0,699 ± 0,075 g
 Hirngewicht: 0,073 ± 0,008 g
 Relatives Hirngewicht: 10,43 ± 1,07 %

Aufarbeitung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
			U	A	R	Gesamt
Fraktionierung	I	(18)	3,00	0,66	nicht meßbar	3,66
	II	(19)	2,93	0,55	nicht meßbar	3,48
	III	(18)	3,07	0,60	nicht meßbar	3,67
	IV	(13)	2,37	0,89	nicht meßbar	3,26
			2,84 ± 0,32	0,68 ± 0,15	nicht meßbar	3,52 ± 0,19

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle II

Fetale Ratten, Gestationsalter 18 Tage

Körpergewicht: 1,208 $\pm$ 0,092 g
Hirngewicht: 0,096 $\pm$ 0,0000 g
Relatives Hirngewicht: 7,99 $\pm$ 0,87 %

Aufarbeitung	Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
		U	A	R	Gesamt
Fraktionierung	I (12)	2,04	1,46	nicht meßbar	3,50
	II (9)	3,00	1,85	nicht meßbar	4,85
	III (9)	3,65	1,30	nicht meßbar	4,95
	IV (13)	2,59	0,88	nicht meßbar	3,47
	V (13)	2,79	0,86	nicht meßbar	3,65
	VI (13)	2,76	1,21	nicht meßbar	3,97
	VII (11)	2,70	1,37	nicht meßbar	4,07
		2,79 $\pm$ 0,48	1,28 $\pm$ 0,34	nicht meßbar	4,07 $\pm$ 0,61

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle III

Fetale Ratten, Gestationsalter 19 Tage

Körpergewicht: 1,895 ± 0,139 g
 Hirngewicht: 0,121 ± 0,0087 g
 Relatives Hirngewicht: 6,37 ± 0,5 %

Aufarbeitung	Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
		U	A	R	Gesamt
Fraktio- nierung	I (10)	3,32	1,19	nicht meßbar	4,51
	II (11)	2,60	1,28	nicht meßbar	3,88
	III (6)	3,15	1,29	nicht meßbar	4,44
	IV (7)	3,39	1,62	nicht meßbar	5,01
	V (9)	3,36	1,55	nicht meßbar	4,91
	VI (10)	3,03	1,29	nicht meßbar	4,32
	VII (11)	2,88	1,17	nicht meßbar	4,05
	VIII (8)	3,48	1,78	nicht meßbar	5,26
		3,15 ± 0,3	1,40 ± 0,22	nicht meßbar	4,55 ± 0,48

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle IV

Fetale Ratten, Gestationsalter 20 Tage

Körpergewicht: 3,19 ± 0,3 g
Hirngewicht: 0,157 ± 0,01 g
Relatives Hirngewicht: 4,96 ± 0,45 %

Aufarbeitung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
			U	A	R	Gesamt
Fraktionierung	I	(11)	3,09	1,70	nicht meßbar	4,79
	II	(8)	2,80	1,37	nicht meßbar	4,27
	III	(7)	2,96	1,37	nicht meßbar	4,33
	IV	(10)	3,05	1,63	nicht meßbar	4,68
	V	(10)	3,17	1,78	nicht meßbar	4,95
	VI	(11)	2,10	1,62	nicht meßbar	3,72
	VII	(13)	4,10	1,41	nicht meßbar	5,51
	VIII	(9)	3,19	1,50	nicht meßbar	4,69
	IX	(10)	3,10	1,74	nicht meßbar	4,84
			3,06 ± 0,51	1,57 ± 0,16	nicht meßbar	4,64 ± 0,5

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle V

Fetale Ratten, Gestationsalter 21 Tage

Körpergewicht: 4,69 ± 0,54 g
Hirngewicht: 0,192 ± 0,02 g
Relatives Hirngewicht: 4,62 ± 0,41 %

Aufarbeitung	Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
		U	A	R	Gesamt
Fraktio- nierung	I (13)	3,42	1,41	0,30	5,13
	II (10)	3,70	2,16	0,35	6,21
	III (12)	3,39	1,75	0,20	5,34
	IV (11)	2,94	1,95	0,25	5,14
	V (10)	3,67	1,92	0,31	5,90
	VI (12)	4,78	1,94	0,46	7,18
	VII (8)	3,25	2,03	0,28	5,56
	VIII (9)	3,93	1,99	0,19	6,11
	IX (10)	2,96	1,81	nicht meßbar	4,77
	X (5)	3,28	2,08	nicht meßbar	5,36
		3,53 ± 0,54	1,90 ± 0,21	0,23 ± 0,15	5,67 ± 0,7

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle VI

Neugeborene Ratten (Gestationsalter 22 Tage)

Körpergewicht: 6,111 $\pm$ 0,52 g
 Hirngewicht: 0,258 $\pm$ 0,017 g
 Relatives Hirngewicht: 4,23 $\pm$ 0,25 %

Aufarbeitung		Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
Fraktionierung	Probe	U	A	R	Gesamt	Total-extraktion
I	(5)	5,09	2,69	0,70	8,48	
II	(7)	4,43	3,93	0,48	8,84	
III	(4)	5,10	3,20	0,34	8,64	
IV	(5)	4,61	3,67	0,25	8,53	
V	(5)	4,67	3,93	0,38	8,98	
VI	(5)	4,66	2,9	0,29	7,85	
VII	(5)	4,27	2,89	0,47	7,63	
VIII	(5)	4,66	3,76	0,22	8,64	
IX	(5)	4,58	3,42	0,43	8,34	
X	(5)	4,20	3,59	0,41	8,20	
Total-extraktion in Äthanol Eisessig	I (4) II (4) III (4) IV (3) V (3) VI (4)					7,00 6,99 7,11 9,00 8,44 7,58
		4,63 $\pm$ 0,3	3,4 $\pm$ 0,45	0,39 $\pm$ 0,14	8,41 $\pm$ 0,42	7,69 $\pm$ 0,85

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle VII

2 Tage alte Ratten (Gestationsalter 24 Tage)

Körpergewicht: 6,63 $\pm$ 0,63 g
 Hirngewicht: 0,318 $\pm$ 0,017 g
 Relatives Hirngewicht: 4,83 $\pm$ 0,44 %

Aufarbeitung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				Total- extraktion
			U	A	R	Gesamt	
Fraktio- nierung		I (5)	4,65	3,77	1,09	9,51	
		II (4)	3,88	3,09	0,89	7,86	
		III (4)	5,26	3,02	0,76	9,04	
		IV (4)	5,83	4,26	0,55	10,64	
		V (4)	4,98	3,43	0,79	9,2	
		VI (4)	4,65	3,10	0,61	8,36	
		VII (4)	4,69	4,46	1,00	10,15	
		VIII (4)	5,40	3,78	0,67	9,65	
		IX (4)	5,04	4,22	0,95	10,21	
		X (4)	4,74	4,22	0,61	9,57	
		XI (4)	4,52	3,47	0,87	8,86	
Total- extraktion in Äthanol Eisessig		I (3)					9,64
		II (3)					8,63
		III (3)					8,17
		IV (3)					9,82
		V (3)					9,64
		VI (3)					7,88
		VII (3)					8,01
		VIII (3)					8,39
			4,88 $\pm$ 0,51	3,71 $\pm$ 0,53	0,8 $\pm$ 0,18	9,37 $\pm$ 0,82	8,77 $\pm$ 0,8

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle VIII

4 Tage alte Ratten (Gestationsalter 26 Tage)

Körpergewicht: 9,82 ± 1,08 g
Hirngewicht: 0,471 ± 0,045 g
Relatives Hirngewicht: 4,76 ± 0,4 %

Aufarbeitung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
			U	A	R	Gesamt	Total extraktion
Fraktio- nierung	I	(4)	4,51	4,28	1,00	9,79	
	II	(4)	3,91	3,71	1,04	8,66	
	III	(4)	3,68	3,67	0,98	8,33	
	IV	(3)	5,93	3,63	0,74	10,30	
	V	(3)	5,48	3,50	0,85	9,83	
	VI	(3)	5,60	4,10	0,45	10,15	
	VII	(3)	5,54	3,74	0,92	10,20	
	VIII	(4)	4,01	4,25	0,75	9,01	
Total- extraktion in Äthanol Eisessig	I	(2)					10,75
	II	(2)					10,59
	III	(2)					9,72
	IV	(2)					7,73
	V	(2)					10,79
			4,83 ± 0,9	3,86 ± 0,3	0,84 ± 0,19	9,53 ± 0,76	9,92 ± 1,3

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle IX

6 Tage alte Ratten (Gestationsalter 28 Tage)

Körpergewicht: 11,871 $\pm$ 0,887 g
 Hirngewicht: 0,584 $\pm$ 0,042 g
 Relatives Hirngewicht: 4,94 $\pm$ 0,37 %

Aufarbeitung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
Fraktionierung			U	A	R	Gesamt	Total- extraktion
	I	(2)	4,81	4,33	1,09	10,23	
	II	(2)	4,44	4,58	1,06	10,08	
	III	(2)	4,33	4,36	1,10	9,79	
	IV	(2)	5,23	4,39	1,05	10,67	
	V	(2)	3,32	4,78	0,71	8,81	
	VI	(2)	4,92	5,03	1,07	11,02	
	VII	(2)	4,71	5,81	1,08	11,60	
	VIII	(2)	4,85	4,60	0,81	10,26	
	IX	(3)	3,97	3,89	1,30	9,16	
	X	(3)	4,21	3,83	1,24	9,28	
	XI	(3)	3,74	4,04	1,24	9,02	
	XII	(3)	4,27	3,92	0,96	9,15	
	XIII	(3)	4,24	3,22	1,16	8,62	
	XIV	(3)	3,81	4,17	1,28	9,26	
	XV	(3)	3,94	4,52	1,83	10,29	
	XVI	(3)	3,75	4,91	1,43	10,09	
Total- extraktion in Äthanol Eisessig	I II III IV V VI	(2) (2) (2) (2) (2) (2)					10,98 9,41 9,17 9,66 8,77 10,52
			4,28 ± 0,52	4,4 ± 0,59	1,15 ± 0,26	9,83 ± 0,84	9,75 ± 0,84

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

8 Tage alte Ratten (Gestationsalter 30 Tage)

Körpergewicht: 13,48 ± 1,88 g
Hirngewicht: 0,708 ± 0,056 g
Relatives Hirngewicht: 5,33 ± 0,71 %

Aufarbeitung		Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
Fraktionierung	Probe	U	A	R	Gesamt	Total-extraktion
I	(2)	4,74	4,97	0,79	10,50	9,27 8,55 9,17 9,06 9,27 11,11 9,46 8,96 8,95 9,67 11,37 11,4 11,73 11,63 13,52
II	(2)	3,73	4,74	1,17	9,64	
III	(2)	4,25	5,24	1,20	10,69	
IV	(2)	4,08	5,29	0,78	10,15	
V	(2)	4,3	4,78	1,27	10,35	
VI	(2)	4,68	4,32	1,17	10,17	
VII	(2)	4,56	4,65	1,00	10,21	
VIII	(2)	4,19	5,24	1,02	10,45	
IX	(2)	4,24	5,07	1,08	10,39	
X	(2)	4,19	4,67	1,37	10,23	
I	(1)					
II	(1)					
III	(1)					
IV	(1)					
V	(1)					
VI	(1)					
VII	(1)					
VIII	(1)					
IX	(1)					
X	(1)					
XI	(2)					
XII	(2)					
XIII	(2)					
XIV	(2)					
XV	(2)					
		4,3 ± 0,3	4,9 ± 0,32	1,09 ± 0,19	10,28 ± 0,28	10,21 ± 1,46

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XI

10 Tage alte Ratten (Gestationsalter 32 Tage)

Körpergewicht: $18,94 \pm 2,29$ g
 Hirngewicht: $0,866 \pm 0,118$ g
 Relatives Hirngewicht: $4,61 \pm 0,56$ %

Aufarbeitung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
			U	A	R	Gesamt	Total- extraktion
Fraktio- nierung	I	(1)	3,86	4,69	1,53	10,08	
	II	(1)	4,41	4,51	1,56	10,48	
	III	(2)	4,38	5,31	1,58	11,27	
	IV	(2)	4,23	5,98	0,99	11,20	
	V	(2)	4,60	6,17	1,64	12,41	
	VI	(2)	4,28	5,75	1,34	11,37	
	VII	(2)	5,18	6,05	1,69	12,92	
	VIII	(2)	4,79	4,70	1,76	11,25	
	IX	(2)	4,15	4,60	1,24	9,99	
	X	(2)	4,71	4,54	1,43	11,08	
	XI	(2)	4,29	3,80	1,49	9,58	
	XII	(2)	4,21	4,79	1,37	10,37	
	XIII	(2)	4,66	5,34	1,04	11,04	
Total- extraktion in Äthanol Eisessig	I	(1)					12,33
	II	(1)					12,16
	III	(1)					11,86
	IV	(1)					13,34
	V	(1)					11,06
	VI	(1)					12,38
	VII	(1)					11,71
	VIII	(1)					9,70
	IX	(1)					9,94
	X	(1)					10,40
			$4,44 \pm 0,34$	$5,10 \pm 0,73$	$1,44 \pm 0,24$	$11,00 \pm 0,94$	$11,49 \pm 1,18$

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XII

12 Tage alte Ratten (Gestationsalter 34 Tage)

Körpergewicht: 21,44 $\pm$ 3,84 g
 Hirngewicht: 1,01 $\pm$ 0,09 g
 Relatives Hirngewicht: 4,78 $\pm$ 0,51 %

Aufarbeitung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
			U	A	R	Gesamt	Total- extraktion
Fraktio- nierung		(2)	4,74	4,59	1,73	11,06	
	I	(2)	4,19	4,87	1,42	10,48	
	II	(2)	4,44	5,05	1,16	10,65	
	III	(2)	4,79	4,50	1,49	10,78	
	IV	(2)	4,21	5,12	1,03	10,36	
	V	(2)	3,94	4,87	1,33	10,14	
	VI	(2)	4,12	4,97	1,02	10,11	
	VII	(2)	3,98	5,17	1,56	10,71	
	VIII	(1)	4,81	6,90	1,63	13,34	
	IX	(1)	6,15	6,17	1,66	13,98	
	X	(1)	4,45	4,81	1,12	10,38	
	XI	(1)	4,59	4,96	1,29	10,84	
	XII	(1)	6,02	5,20	1,39	12,61	
	XIII	(1)	6,49	4,66	1,35	12,50	
XIV	(1)						
Total- extraktion in Äthanol Eisessig	I	(1)					11,55
	II	(1)					11,94
	III	(1)					10,42
	IV	(1)					10,96
	V	(1)					10,71
	VI	(1)					11,45
	VII	(1)					10,21
			4,78 ± 0,84	5,13 ± 0,65	1,37 ± 0,23	11,28 ± 1,27	11,03 ± 0,64

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XIII

14 Tage alte Ratten (Gestationsalter 36 Tage)

Körpergewicht:

25,33 $\pm$ 2,65 g

Hirngewicht:

1,089 $\pm$ 0,046 g

Relatives Hirngewicht:

4,32 $\pm$ 0,41 %

Aufarbeitung		Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
Probe		U	A	R	Gesamt	Total- extraktion
Fraktio- nierung	I (2)	5,21	5,52	1,94	12,67	
	II (2)	5,26	5,60	1,80	12,66	
	III (2)	5,62	5,65	1,95	13,22	
	IV (2)	5,03	5,59	2,29	12,91	
	V (2)	5,35	5,20	1,64	12,19	
	VI (2)	5,15	4,97	2,47	12,59	
	VII (2)	4,99	5,21	2,24	12,44	
	VIII (2)	4,76	4,88	2,36	12,00	
	IX (2)	5,12	5,11	1,67	11,90	
	X (2)	4,76	4,80	2,05	11,61	
	XI (1)	4,61	5,63	1,44	11,68	
	XII (1)	4,75	6,55	1,69	12,99	
	XIII (1)	4,81	5,49	1,60	11,90	
	XIV (1)	4,53	5,54	1,54	11,61	
Total- extraktion in Äthanol Eisessig	I (1)					14,65
	II (1)					12,01
	III (1)					11,78
	IV (1)					11,43
	V (1)					11,23
	VI (1)					11,70
	VII (1)					12,00
	VIII (1)					11,64
	IX (1)					11,44
	X (1)					11,65
	XI (1)					11,63
	XII (1)					12,06
	XIII (1)					11,25
		5,0 $\pm$ 0,31	5,41 $\pm$ 0,44	1,91 $\pm$ 0,33	12,31 $\pm$ 0,54	11,88 $\pm$ 0,87

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XIV

20 Tage alte Ratten (Gestationsalter 42 Tage)

Körpergewicht: $45,56 \pm 8,36$ g
 Hirngewicht: $1,344 \pm 0,087$ g
 Relatives Hirngewicht: $3,02 \pm 0,46$ %

Aufarbeitung		Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
Probe		U	A	R	Gesamt	Total- extraktion
Fraktionierung	I (1)	3,74	5,84	1,69	11,27	
	II (1)	4,98	5,80	2,21	12,99	
	III (1)	3,65	5,54	1,93	12,12	
	IV (1)	4,65	5,67	1,55	11,87	
	V (1)	5,18	6,05	1,58	12,81	
	VI (1)	4,31	5,51	1,76	11,58	
	VII (1)	3,12	5,99	2,19	11,30	
	VIII (1)	3,25	5,66	2,03	10,94	
	IX (1)	3,41	5,73	1,58	10,72	
	X (1)	3,74	5,45	1,65	10,84	
	XI (1)	4,26	6,17	0,70	11,13	
	XII (1)	5,33	7,01	0,92	13,26	
	XIII (1)	4,54	6,58	2,34	13,46	
	XIV (1)	4,15	6,47	2,11	12,73	
	XV (1)	4,23	6,32	2,28	12,83	
	XVI (1)	5,04	7,31	2,39	14,74	
Extraktion in Äthanol Eisessig	I (1)					12,94
	II (1)					12,79
	III (1)					12,41
	IV (1)					13,70
	V (1)					10,61
	VI (1)					11,76
		$4,22 \pm 0,7$	$6,07 \pm 0,55$	$1,81 \pm 0,49$	$12,16 \pm 1,15$	$12,37 \pm 1,07$

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XV

Körpergewicht: 71,61 $\pm$ 6,62
 Hirngewicht: 1,399 $\pm$ 0,101
 Relatives Hirngewicht: 1,97 $\pm$ 0,16

30 Tage alte Ratten (Gestationsalter 52 Tage)

Aufarbeitung		Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
Probe		U	A	R	Gesamt	Total- extraktion
Fraktionierung	I (1)	4,91	5,04	1,95	11,90	
	II (1)	5,14	5,61	1,87	12,62	
	III (1)	4,78	5,59	2,07	12,44	
	IV (1)	4,97	5,66	2,32	12,95	
	V (1)	4,89	5,55	1,86	12,30	
	VI (1)	4,65	5,52	2,16	12,33	
	VII (1)	5,36	6,04	1,59	12,99	
	VIII (1)	4,11	5,75	2,05	11,91	
	IX (1)	4,49	7,61	2,04	14,14	
	X (1)	5,31	6,10	3,85	15,26	
	XI (1)	5,30	5,86	3,69	14,85	
	XII (1)	4,81	5,89	2,91	13,61	
	XIII (1)	4,91	5,43	2,71	13,05	
						13,46 13,43 15,03 12,60 13,02 13,03
	Totalextraktion in Äthanol Essig					
I (1) II (1) III (1) IV (1) V (1) VI (1)		4,9 $\pm$ 0,35	5,82 $\pm$ 0,61	2,39 $\pm$ 0,71	13,10 $\pm$ 1,08	13,43 $\pm$ 0,85

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

e XVI

e alte Ratten (Gestationsalter 82 Tage)

Körpergewicht: 165,9 ± 33,8 g
 Hirngewicht: 1,631 ± 0,118 g
 Relatives Hirngewicht: 1,02 ± 0,18 %

Beitrag		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
			U	A	R	Gesamt	Total- extraktion
o- ng	I	(1)	4,89	5,70	3,29	13,88	
	II	(1)	4,82	6,04	3,26	14,12	
	III	(1)	4,17	5,29	2,61	12,27	
	IV	(1)	5,06	5,45	4,40	14,91	
	V	(1)	4,76	5,62	3,23	13,61	
	VI	(1)	5,06	5,40	2,89	13,35	
	VII	(1)	5,91	5,70	3,15	13,76	
	VIII	(1)	5,19	5,65	3,33	14,17	
	IX	(1)	4,84	5,82	2,95	13,61	
	X	(1)	4,76	5,83	3,27	13,86	
	XI	(1)	5,45	5,18	2,91	13,54	
	XII	(1)	5,15	6,55	3,78	15,48	
	XIII	(1)	4,61	6,05	2,79	13,44	
	XIV	(1)	4,89	6,28	3,82	14,99	
	XV	(1)	4,75	5,50	2,67	12,92	
	XVI	(1)	4,56	7,07	3,29	14,92	
	XVII	(1)	4,46	6,12	3,60	14,21	
	XVIII	(1)	4,96	6,37	3,33	14,60	
	XIX	(1)	4,85	5,90	4,01	14,71	
	XX	(1)	4,91	6,11	2,82	13,73	
- ktion hanol sig	I	(1)					13,40
	II	(1)					10,34
	III	(1)					11,73
	IV	(1)					14,14
	V	(1)					14,02
	VI	(1)					16,02
	VII	(1)					15,02
	VIII	(1)					16,28
	IX	(1)					14,76
	X	(1)					15,54
	XI	(1)					16,03
	XII	(1)					15,34
	XIII	(1)					16,57
			4,85 ± 0,25	5,88 ± 0,46	3,27 ± 0,47	14,00 ± 0,77	14,55 ± 1,84

klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XVII

Körpergewicht: 272 $\pm$ 12 g
 Hirngewicht: 1,78 $\pm$ 0,07 g
 Relatives Hirngewicht: 0,65 $\pm$ 0,04 %

120 Tage alte Ratten (Gestationsalter 142 Tage)

Aufarbeitung		Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)				
Fraktionierung	Probe	U		R	Gesamt	Total-extraktion
			A			
I	(1)	4,94	6,62	2,95	14,51	
II	(1)	5,11	5,78	3,26	14,15	
III	(1)	4,94	6,16	3,60	14,70	
IV	(1)	5,03	6,26	3,02	14,31	
V	(1)	5,34	6,26	3,47	15,07	
VI	(1)	5,11	6,49	4,06	15,66	
VII	(1)	4,62	6,56	4,28	15,46	
VIII	(1)	5,19	4,98	3,87	14,04	
IX	(1)	5,21	6,61	3,85	15,67	
X	(1)	4,97	6,27	3,80	15,04	
Total-extraktion in Äthanol-Eisessig	(1)					14,12
	(1)					13,08
	(1)					15,63
	(1)					15,89
	(1)					15,19
	(1)					13,60
	(1)					12,78
	(1)					15,16
		5,05 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,5	3,62 $\pm$ 0,44	14,86 $\pm$ 0,61	14,43 $\pm$ 1,2

In Klammern ist die Anzahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XVIII

Körpergewicht: 3,24 $\pm$ 0,197 g
 Hirngewicht: 0,154 $\pm$ 0,011 g
 Relatives Hirngewicht: 4,76 $\pm$ 0,36 %

Fetale Ratten, Gestationsalter 20 Tage

Behandlung		Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
Probe		U	A	R	Gesamt
DFP 1,8 mg/kg den Mutter- tieren s.c. appliziert 1 h	I (7)	4,76	1,73	0,38	6,87
	II (7)	4,21	1,93	0,38	6,52
	III (8)	4,05	1,9	nicht meßbar	5,95
	IV (10)	3,32	1,72	nicht meßbar	5,04
	V (6)	3,94	1,72	nicht meßbar	5,66
	VI (9)	3,27	1,98	0,37	5,62
	VII (8)	4,28	2,14	0,4	6,82
	VIII (7)	3,62	2,75	nicht meßbar	6,37
	IX (5)	4,3	2,95	0,55	7,8
		3,97 $\pm$ 0,49	2,09 $\pm$ 0,46	0,23 $\pm$ 0,23	6,29 $\pm$ 0,83

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XIX

Körpergewicht: 3,06 $\pm$ 0,221 g
 Hirngewicht: 0,151 $\pm$ 0,000 g
 Relatives Hirngewicht: 4,94 $\pm$ 0,31 %

Fetale Ratten, Gestationsalter 20 Tage

Behandlung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
			U	A	R	Gesamt
DFP 1,8 mg/kg den Mutter- tieren s.c. appliziert 24 h		I	3,72	2,37	0,32	6,41
		II	4,26	2,57	nicht meßbar	6,83
		III	4,98	2,43	nicht meßbar	7,41
		IV	5,49	2,02	nicht meßbar	7,51
		V	6,31	2,26	nicht meßbar	8,57
		VI	5,14	2,05	nicht meßbar	7,19
		VII	4,79	1,8	nicht meßbar	6,59
		VIII	4,44	2,0	nicht meßbar	6,44
		IX	3,5	2,2	nicht meßbar	5,7
			4,74 $\pm$ 0,88	2,19 $\pm$ 0,24	0,04 $\pm$ 0,11	6,96 $\pm$ 0,83

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XX

Fetale Ratten, Gestationsalter 20 Tage

Körpergewicht: 3,15 ± 0,223 g
 Hirngewicht: 0,149 ± 0,089 g
 Relatives Hirngewicht: 4,72 ± 0,28 %

Behandlung	Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
		U	A	R	Gesamt
DFP 1,8 mg/kg den Mutter- tieren am 11. Tag der Gestation s.c. appliziert	I (9)	3,28	1,55	nicht meßbar	4,83
	II (7)	3,93	1,64	nicht meßbar	5,57
	III (9)	3,94	1,34	nicht meßbar	5,28
	IV (10)	2,39	1,51	nicht meßbar	3,9
	V (8)	2,9	1,37	nicht meßbar	4,27
	VI (8)	3,19	1,4	nicht meßbar	4,59
	VII (10)	3,19	1,77	nicht meßbar	4,96
		3,26 ± 0,55	1,45 ± 0,11	nicht meßbar	4,71 ± 0,57

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXI

Körpergewicht: 258,0 $\pm$ 13,3 g
 Hirngewicht: 1,79 $\pm$ 0,03 g
 Relatives Hirngewicht: 0,7 $\pm$ 0,04 %

Ausgewachsene Ratten, Gestationsalter 142 Tage

Behandlung		Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
Probe		U	A	R	Gesamt
DFP 1,8 mg/kg s.c. 1 h	I (1)	10,18	7,84	4,47	22,49
	II (1)	8,13	8,82	4,43	21,38
	III (1)	10,32	7,92	5,96	24,2
	IV (1)	10,9	10,29	4,96	26,15
	V (1)	10,03	8,94	3,6	22,57
	VI (1)	12,93	7,92	3,83	24,68
		10,24 $\pm$ 1,55	8,62 $\pm$ 0,95	4,54 $\pm$ 0,85	23,58 $\pm$ 1,75

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXII

Körpergewicht: 295,4 $\pm$ 39,7 g
 Hirngewicht: 1,761 $\pm$ 0,086 g
 Relatives Hirngewicht: 0,61 $\pm$ 0,07 %

Ausgewachsene Ratten, Gestationsalter 142 Tage

Behandlung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
			U	A	R	Gesamt
DFP		I (1)	4,89	6,47	3,51	14,87
1,8 mg/kg		II (1)	5,56	5,83	3,54	14,93
s.c.		III (1)	4,61	6,82	4,65	16,08
		IV (1)	5,94	6,45	3,65	16,04
24 h		V (1)	5,1	6,55	4,37	16,02
		VI (1)	5,64	5,58	4,08	15,3
		VII (1)	4,76	7,19	3,63	15,57
			5,21 $\pm$ 0,5	6,41 $\pm$ 0,55	3,92 $\pm$ 0,45	15,54 $\pm$ 0,52

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXIII

Körpergewicht: 251,0 $\pm$ 16,0 g
 Hirngewicht: 1,699 $\pm$ 0,08 g
 Relatives Hirngewicht: 0,67 $\pm$ 0,05 %

Ausgewachsene Ratten, Gestationsalter 142 Tage

Behandlung	Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
		U	A	R	Gesamt
DFP 1,8 mg/kg s.c. 9 Tage	I (1)	3,74	5,90	2,90	12,72
	II (1)	5,17	6,14	4,0	15,31
	III (1)	4,78	6,4	3,44	14,62
	IV (1)	5,05	5,89	3,39	14,33
	V (1)	4,59	6,1	3,67	14,36
	VI (1)	5,03	6,43	2,82	14,28
	VII (1)	6,17	6,68	3,12	15,97
	VIII (1)	4,97	5,77	3,8	14,54
	IX (1)	5,05	5,99	3,93	14,97
	X (1)	5,07	6,88	3,41	15,36
		4,96 $\pm$ 0,6	6,23 $\pm$ 0,36	3,46 $\pm$ 0,4	14,65 $\pm$ 0,87

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXIV

Fetale Ratten, Gestationsalter 20 Tage

Körpergewicht: 3,19 ± 0,25 g
 Hirngewicht: 0,151 ± 0,000 g
 Relatives Hirngewicht: 4,72 ± 0,34 %

Behandlung	Probe	Gewebs- konzentration im Meßansatz	Gesamte Säure- freisetzung n-Mol/mg/min	unspezifische Säurefreisetzung n-Mol/mg/min	((AchE)) n-Mol Ach/mg/min
unbehandelt	I (5)	5 %	0,25	0	0,25
	II (5)	5 %	0,2	0	0,2
	III (5)	5 %	0,19	0	0,19
	IV (5)	5 %	0,25	0	0,25
	V (5)	5 %	0,21	0	0,21
	VI (5)	5 %	0,25	0	0,25
	VII (5)	5 %	0,63	0	0,63
	VIII (5)	5 %	0,75	0	0,75
	IX (5)	5 %	0,45	0	0,45
	X (5)	5 %	0,28	0	0,28
					0,25 ± 0,2

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabella XXV

Erkrankte Ratten, Gestationsdauer 20 Tage

Körpergewicht: $1,5 \pm 0,2$ g
 Hirngewicht: $0,14 \pm 0,01$ g
 relative Hirngewicht: $0,09 \pm 0,01$

Behandlung	Probe	Gewebekonzentration im Meßansatz	Gesamte saurefreisetzung n-Mol/mg/min	unspezifische saurefreisetzung n-Mol/mg/min	((Ach.)) n-Mol Ach/mg/min
DGP 1,2 mg/kg Gesamtdosis: Tiere in 100 g appetitlos	I (5)	10%	7,00	0	7,00
	II (5)	10%	0,10	0	0,10
	III (5)	10%	0,10	0	0,10
	IV (5)	10%	0	0	0
	V (5)	10%	0	0	0
	VI (5)	10%	0	0	0
	VII (5)	10%	0	0	0
	VIII (5)	10%	0	0	0
	IX (5)	10%	0	0	0
	X (5)	10%	0	0	0
					0,015 $\pm$ 0,007

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXVII

Körpergewicht: 3,18 $\pm$ 0,25 g
 Hirngewicht: 0,148 $\pm$ 0,0000 g
 Relatives Hirngewicht: 4,69 $\pm$ 0,38 %

Fetale Ratten, Gestationsalter 20 Tage

Behandlung	Probe	Gewebs- konzentration im Meßansatz	Gesamte Säure- freisetzung n-Mol/mg/min	unspezifische Säurefreisetzung n-Mol/mg/min	((AchE)) n-Mol Ach/mg/min
DPP 1,8 mg/kg den Mutter- tieren am 11. Tag der Gestation s.c. appliziert	I (4) II (4) III (5) IV (5) V (4) VI (4) VII (5) VIII (5) IX (5) X (5) XI (5)	5 % 5 % 5 % 5 % 5 % 5 % 5 % 5 % 5 % 5 % 5 %	0,56 0,61 0,63 0,59 0,63 0,67 0,81 0,78 0,78 0,75 0,72	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0,56 0,61 0,63 0,59 0,63 0,67 0,81 0,78 0,78 0,75 0,72
					0,68 $\pm$ 0,09

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXVIII

Körpergewicht: 270,0 ± 11,6 g
 Hirngewicht: 1,753 ± 0,062 g
 Relatives Hirngewicht: 0,65 ± 0,04 %

Muttertiere

Behandlung	Probe	Gewebs- konzentration im Meßansatz	Gesamte Säure- freisetzung n-Mol/mg/min	unspezifische Säurefreisetzung n-Mol/mg/min	((AchE)) n-Mol Ach/mg/min
unbehandelt	I (1) II (1) III (1) IV (1) V (1) VI (1) VII (1) VIII (1) IX (1) X (1)	1 % 1 % 1 % 1 % 1 % 1 % 1 % 1 % 1 % 1 %	8,75 10,63 10,33 9,7 10,0 10,33 9,7 9,38 10,63 10,33	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	8,75 10,63 10,33 9,7 10,0 10,33 9,7 9,38 10,63 10,33
					9,98 ± 0,6

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXIX

Körpergewicht: 268,0 $\pm$ 12,3 g
 Hirngewicht: 1,753 $\pm$ 0,114 g
 Relatives Hirngewicht: 0,65 $\pm$ 0,03 %

Muttertiere

Behandlung	Probe	Gewebs- konzentration im Meßansatz	Gesamte Säure- freisetzung n-Mol/mg/min	unspezifische Säurefreisetzung n-Mol/mg/min	((AchE)) n-Mol Ach/mg/min
DFP 1,8 mg/kg s.c. 1 h	I	5	0,09	0	0,09
	II	5	0,43	0	0,43
	III	5	0,29	0	0,29
	IV	5	0,52	0	0,52
	V	5	0,38	0	0,38
	VI	5	0,3	0	0,3
	VII	5	0,13	0	0,13
	VIII	5	0,52	0	0,52
	IX	5	0,44	0	0,44
	X	5	0,22	0	0,22
					0,33 $\pm$ 0,15

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXX

Körpergewicht: 277,0 ± 9,5 g
 Hirngewicht: 1,757 ± 0,058 g
 Relatives Hirngewicht: 0,63 ± 0,02

Muttertiere

Behandlung	Probe	Gewebs- konzentration im Meßansatz	Gesamte Säure- freisetzung n-Mol/mg/min	unspezifische Säurefreisetzung n-Mol/mg/min	((AchE)) n-Mol Ach/mg/min
DFP 1,8 mg/kg S.C. 24 h	I (1)	5	1,02	0	1,02
	II (1)	5	1,25	0	1,25
	III (1)	5	0,82	0	0,82
	IV (1)	5	1,17	0	1,17
	V (1)	5	0,92	0	0,92
	VI (1)	5	1,09	0,63	0,46
	VII (1)	5	1,5	0,12	1,38
	VIII (1)	5	1,37	0,47	0,9
	IX (1)	5	1,25	0,42	0,83
	X (1)	5	0,83	0,31	0,52
					0,93 ± 0,3

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXXI

Körpergewicht: 275,7 $\pm$ 11,3 g
 Hirngewicht: 1,746 $\pm$ 0,077 g
 Relatives Hirngewicht: 0,63 $\pm$ 0,02 %

Muttertiere

Behandlung	Probe	Gewebs- konzentration im Meßansatz	Gesamte Säure- freisetzung n-Mol/mg/min	unspezifische Säurefreisetzung n-Mol/mg/min	((AchE)) n-Mol Ach/mg/min
1,8 mg/kg, DFP, s.c. appliziert am 11. Tag der Gestation	I (1) II (1) III (1) IV (1) V (1) VI (1) VII (1)	1 % 1 % 1 % 1 % 1 % 1 % 1 %	5,33 4,7 4,38 5,63 4,7 5,63 4,7	0 0 0 0 0 0 0	5,33 4,7 4,38 5,63 4,7 5,63 4,7
					5,01 $\pm$ 0,51

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXXII

Körpergewicht: 3,36 ± 0,23 g
 Hirngewicht: 0,154 ± 0,013 g
 Relatives Hirngewicht: 4,57 ± 0,32 %

Fetale Ratten, Gestationsalter 20 Tage

Behandlung		Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
			U	A	R	Gesamt
Urethan	I	(10)	3,94	1,56	nicht meßbar	5,5
1,5 g/kg	II	(9)	3,99	2,05	nicht meßbar	6,04
den Mutter-	III	(7)	4,97	2,11	nicht meßbar	7,08
tieren	IV	(10)	4,58	2,0	nicht meßbar	6,58
i.p.	V	(10)	3,76	2,23	nicht meßbar	5,99
appliziert	VI	(8)	5,11	2,17	nicht meßbar	7,28
	VII	(9)	5,33	2,67	nicht meßbar	8,0
1 h	VIII	(10)	3,98	1,88	0,49	6,35
			4,46 ± 0,62	2,08 ± 0,32	0,06 ± 0,17	6,6 ± 0,81

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXXIII

Körpergewicht: 268,0 $\pm$ 11,35 g
 Hirngewicht: 1,74 $\pm$ 0,093 g
 Relatives Hirngewicht: 0,65 $\pm$ 0,04 %

Ausgewachsene Ratten, Gestationsalter 142 Tage

Behandlung	Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
		U	A	R	Gesamt
Urethan 1,5 g/kg i.p.	I (1)	6,15	6,58	4,63	17,36
	II (1)	4,4	7,0	4,5	15,9
	III (1)	6,14	8,49	5,02	19,65
	IV (1)	4,68	8,67	4,39	17,74
	V (1)	5,08	8,2	4,86	18,14
	VI (1)	6,57	9,03	5,37	20,97
	VII (1)	6,2	8,19	5,45	19,84
	VIII (1)	5,96	8,3	6,13	20,39
	IX (1)	6,25	8,07	4,91	19,23
	X (1)	4,38	8,84	4,64	17,86
		5,58 $\pm$ 0,85	8,14 $\pm$ 0,78	4,99 $\pm$ 0,53	18,71 $\pm$ 1,57

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Tabelle XXXIV

Körpergewicht: 3,32 ± 0,211 g
 Hirngewicht: 0,151 ± 0,0000 g
 Relatives Hirngewicht: 4,57 ± 0,35 g

Fetale Ratten, Gestationsalter 20 Tage

Behandlung	Probe	Acetylcholin n-Mol/g Hirn (Frischgewicht)			
		U	A	R	Gesamt
Atropin 25 mg/kg den Mutter- tieren i. v. appliziert 15 min	I (12)	3,66	1,09	nicht meßbar	4,75
	II (10)	5,12	1,16	nicht meßbar	6,28
	III (10)	4,05	0,95	nicht meßbar	4,98
	IV (11)	3,34	1,34	nicht meßbar	4,68
	V (9)	2,64	1,25	nicht meßbar	3,89
	VI (8)	1,97	1,45	nicht meßbar	5,92
	VII (10)	4,14	1,2	nicht meßbar	5,24
	VIII (10)	3,7	1,12	nicht meßbar	4,82
	IX (9)	3,42	1,34	nicht meßbar	4,76
	X (9)	3,12	1,81	nicht meßbar	4,91
	XI (9)	3,46	1,18	nicht meßbar	4,64
		3,75 ± 0,67	1,26 ± 0,23	nicht meßbar	4,99 ± 0,65

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Table 1. 1/1/1

Atropin 25 mg/kg
i.v.
15 min

Atropin 25 mg/kg i.v. 15 min

Dose		Atropin 25 mg/kg i.v. 15 min			
Atropin 25 mg/kg i.v. 15 min	Dose	n	x	s	Gauss
I	(1)	3,37	3,37	1,02	6,57
II	(1)	3,77	3,77	1,47	9,24
III	(1)	4,97	4,97	2,37	9,67
IV	(1)	3,64	3,64	2,16	10,12
V	(1)	3,35	3,35	1,71	9,69
VI	(1)	4,97	4,97	1,79	10,31
VII	(1)	4,12	4,12	2,11	11,65
VIII	(1)	3,51	3,51	2,09	10,51
IX	(1)	3,95	3,95	1,95	8,35
X	(1)	3,43	3,43	1,85	8,54
XI	(1)	3,35	3,35	2,02	9,07
		3,61 ± 0,32	4,09 ± 0,75	1,95 ± 0,25	9,65 ± 1,0

In Klammern ist die Zahl der Hirne/Probe angegeben.

Herrn Professor Dr. med. H. Kewitz, Direktor des
Instituts für Klinische Pharmakologie der
Freien Universität Berlin, bin ich für die wissen-
schaftliche Anleitung und die großzügige Unterstützung
dieser Arbeit sehr dankbar.

LEBENS LAUF

Am 22. 12. 1940 wurde ich, Eberhard Mann, als Sohn des Offiziers Martin Mann und seiner Ehefrau Annemarie, geborene Böhm, in Guben (Niederlausitz) geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Zwebendorf (Halle) und des altsprachlichen Frhr. von Stein-Gymnasiums in Leverkusen begann ich 1961 nach dem Abitur mit dem Medizinstudium an der Universität Tübingen. Dort blieb ich bis zum Physikum (1964).

Die klinischen Semester studierte ich an der Münchner Universität, wo ich 1967 die Staatsprüfung ablegte. Nach zweijähriger Tätigkeit als Medizinalassistent in München, Leverkusen und Berlin, wo ich unter anderem sechs Monate im Institut für Klinische Pharmakologie der Freien Universität Berlin arbeitete, erhielt ich die Approbation als Arzt im Februar 1970. Mit der Erteilung der Bestallungsurkunde kehrte ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter für 16 Monate an dieses Institut zurück.

Seit Juli 1971 arbeite ich als pädiatrischer Assistenzarzt am Jewish Hospital and Medical Center in Brooklyn, New York.

